

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003589

International filing date: 03 March 2005 (03.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-062812
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2004年 3月 5日

出願番号 Application Number: 特願 2004-062812

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

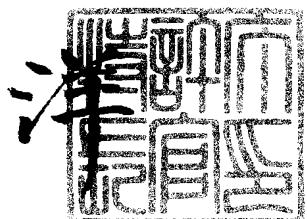
出願人 Applicant(s): 株式会社カネカ

J P 2004-062812

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

2005年 4月13日

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 B040070
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
C12N 1/19
C12N 5/10

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町沖浜町 4-2-21
【氏名】 大窪 雄二

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県西宮市大森町 11-33
【氏名】 松本 圭司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都府中市栄町 1-31-10
【氏名】 高木 正道

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県さいたま市プラザ 57-2
【氏名】 太田 明徳

【特許出願人】

【識別番号】 000000941
【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100086586
【弁理士】
【氏名又は名称】 安富 康男

【選任した代理人】

【識別番号】 100115141
【弁理士】
【氏名又は名称】 野田 慎二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 033891
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0003934

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子とアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子とが導入されている酵母形質転換体であって、これら遺伝子の両方又は何れかが2コピー以上導入されていることを特徴とする酵母形質転換体。

【請求項 2】

ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子とアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子に、ペルオキシソーム配向シグナルが付加されている請求項1に記載の酵母形質転換体。

【請求項 3】

ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子とアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子に、酵母で機能するプロモーター及びターミネーターが接続されている請求項1又は2記載の酵母形質転換体。

【請求項 4】

酵母が、キヤンディダ属である請求項1から3のいずれか1項に記載の酵母形質転換体。

【請求項 5】

酵母がキヤンディダ属の*albicans*種、*ancudensis*種、*atmosphaerica*種、*azyma*種、*bertae*種、*blankii*種、*butyri*種、*conglobata*種、*dendronema*種、*ergastensis*種、*fluviatilis*種、*friedrichii*種、*gropengiesserii*種、*haemulonii*種、*incommunis*種、*insectum*種、*laureliae*種、*maltosa*種、*melibiosica*種、*membranifaciens*種、*mesenterica*種、*natalensis*種、*oregonensis*種、*palmiophilala*種、*parapsilosiss*種、*psudointermedia*種、*quercitrus*種、*rhagii*種、*rugosa*種、*saitoana*種、*sake*種、*schatavii*種、*sequanensis*種、*shenhatae*種、*sorbophila*種、*tropicalis*種、*valdiviana*種又は*vishwanathii*種のいずれかである請求項1から3のいずれか1項に記載の酵母形質転換体。

【請求項 6】

酵母が、キヤンディダ・マルトーサである請求項1から3のいずれか1項に記載の酵母形質転換体。

【請求項 7】

ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子が、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるアエロモナス・キャビエ由来の酵素又は変異体をコードするものである請求項1から6のいずれか1項に記載の酵母形質転換体。

【請求項 8】

アエロモナス・キャビエ由来のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子が、以下の(a)～(h)いずれかのアミノ酸置換を少なくとも一つ以上行ったポリヒドロキシアルカン酸合成酵素変異体をコードするものである請求項7に記載の酵母形質転換体。

- (a) Asn-149をSer
- (b) Asp-171をGly
- (c) Phe-246をSerまたはGln
- (d) Tyr-318をAla
- (e) Ile-320をSer、AlaまたはVal
- (f) Leu-350をVal
- (g) Phe-353をThr、SerまたはHis
- (h) Phe-518をIle

【請求項 9】

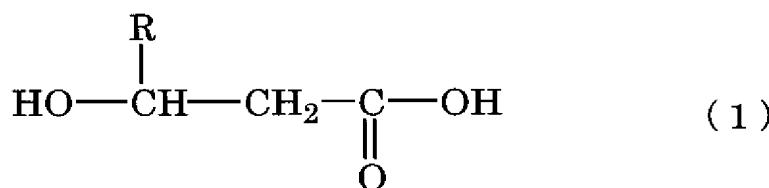
アセトアセチルCoA還元酵素遺伝子が、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるラルストニア・ユートロファ由来の酵素又は変異体をコードするものである請求項1～8の

いずれか 1 項に記載の酵母形質転換体。

【請求項 1 0】

ポリヒドロキシアルカン酸が、下記一般式（1）で示される 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合体である請求項 1～9 記載のいずれか 1 項に記載の酵母形質転換体。

【化 1】

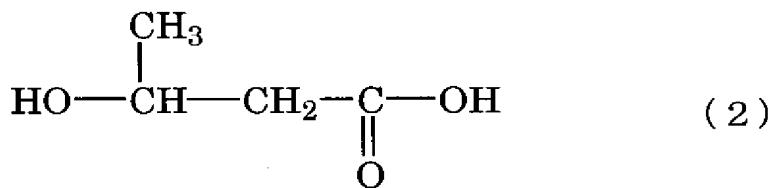


（式中、R は、炭素数 1～13 のアルキル基を表す。）

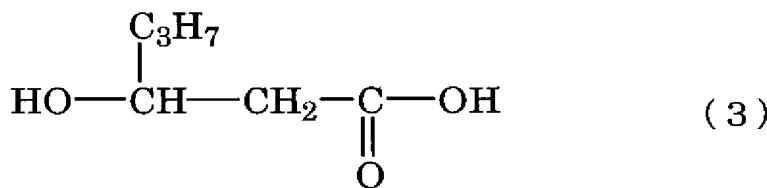
【請求項 1 1】

ポリヒドロキシアルカン酸が、下記一般式（2）で示される 3-ヒドロキシ酪酸と下記一般式（3）で示される 3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルである請求項 1～9 記載のいずれか 1 項に記載の酵母形質転換体。

【化 2】



【化 3】



【請求項 1 2】

請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の酵母形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、前記酵母形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の酵母形質転換体を用いるポリエステルの製造において、酵母形質転換体のアセトアセチル CoA 還元酵素遺伝子の数を制御することによりポリエステルの分子量を制御する方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の酵母形質転換体を用いるポリエステルの製造において、酵母形質転換体のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子の数を制御することによりポリエステルのヒドロキシアルカン酸組成を制御する方法。

【請求項 1 5】

選択マーカー遺伝子として ADE1 遺伝子を持つキャンディダ・マルトーサで分子内相同組換えを行うことにより、当該 ADE1 遺伝子を除去することを特徴とする選択マーカーの回復方法。

【請求項 1 6】

ADE1 遺伝子の上流または下流に ADE1 遺伝子の一部が連結されている請求項 1 5 記

載の選択マークの回復方法。

【請求項 17】

A D E 1 遺伝子が、配列番号 3 で示される塩基配列からなるものである請求項 15 又は 16 記載の選択マークの回復方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規形質転換体およびそれを用いたポリエステルの製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、共重合ポリエステルを酵素合成するために必要な遺伝子、同遺伝子を利用してポリエステルを発酵合成する微生物、及び、その微生物を用いたポリエステルの製造方法に関する。更に、同微生物の育種法にも関する。

【背景技術】

【0002】

現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリヒドロキシアルカン酸（以下、PHAと略す）などのポリエステルを菌体内に蓄積することが知られている。その代表例としては3-ヒドロキシ酪酸（以下、3HBと略す）のホモポリマーであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下、P(3HB)と略す）であり、1925年にバシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) で最初に発見された（非特許文献1）。P(3HB)は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしいプラスチックとして注目されてきた。しかし、P(3HB)は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲が限られる。この為、この性質の改良を目的とした研究がなされてきた。

【0003】

その中で、3-ヒドロキシ酪酸（3HB）と3-ヒドロキシ吉草酸（以下、3HVと略す）とからなる共重合体（以下、P(3HB-co-3HV)）というの製造方法が開示されている（特許文献1、2）。このP(3HB-co-3HV)はP(3HB)に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。しかしながら、実際のところP(3HB-co-3HV)は3HVモル分率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルムなどに使用するのに要求される程、柔軟性が向上しないため、シャンプーボトルや使い捨て剃刀の取っ手など硬質成型体の分野にしか利用されなかった。

【0004】

近年、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸（以下、3HHと略す）との2成分共重合ポリエステル（以下、P(3HB-co-3HH)）というおよびその製造方法について研究がなされた（たとえば、特許文献3、4参照）。これら特許文献のP(3HB-co-3HH)の製造方法は、土壌より単離されたアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) を用いてオレイン酸等の脂肪酸やオリーブオイル等の油脂から発酵生産するものであった。また、P(3HB-co-3HH)の性質に関する研究もなされている（非特許文献2参照）。この報告では、炭素数が12個以上の脂肪酸を唯一の炭素源としてA. caviaeを培養し、3HHが11～19mol%のP(3HB-co-3HH)を発酵生産している。このP(3HB-co-3HH)は3HHモル分率の増加にしたがって、P(3HB)の硬くて脆い性質から次第に柔軟な性質を示すようになり、P(3HB-co-3HV)を上回る柔軟性を示すことが明らかにされた。しかしながら、上記製造方法では菌体量4g/L、ポリマー含量30%でありポリマー生産性が低いことから、実用化に向け更に高い生産性が得られる方法が探索された。

【0005】

P(3HB-co-3HH)を生産するアエロモナス・キャビエ (*A. caviae*) より、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素（以下、PHA合成酵素と略す）遺伝子がクローニングされた（特許文献5、非特許文献3参照）。本遺伝子をラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutrophus*、旧Alcaligenes eutrophus) に導入した形質転換株を用い、炭素源として植物油脂を用いて培養した結果、菌体量4g/L、ポリマー含量80%が達成された（非特許文献4参照）。また、大腸菌等の細菌や植物を宿主としたP(3HB-co-3HH)の製造方法も開示されているが、その生産性は記載されていない（例えは、特許文献6参照）。

【0006】

上記ポリエステルP（3HB-co-3HH）は3HHモル分率を変えることで、硬質ポリマーから軟質ポリマーまで幅広い物性を持つため、テレビの筐体などのように硬さを要求されるものから糸やフィルムなどの柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できる。しかしながら、先に述べた製造方法ではP（3HB-co-3HH）の生産性が依然として低く、P（3HB-co-3HH）の実用化に向けた生産方法としては未だ不十分といわざるを得ない。

【0007】

菌体生産性の高い酵母を宿主とした生分解性ポリエステルの生産研究が幾つか報告されている。Leafらは、酵母の一種であるサッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）にラルストニア・ユートロファ（*R. eutropha*）のPHA合成酵素遺伝子を導入して形質転換体を作製し、グルコースを炭素源として培養することによってP（3HB）の蓄積を確認している（非特許文献5参照）。しかし、上記研究で生産されるポリマー含量は0.5%に留まり、そのポリマーは硬くて脆い性質を有するP（3HB）であった。

【0008】

脂肪酸を炭素源として、酵母サッカロマイセス・セレビシエにシュードモナス属（*Pseudomonas aeruginosa*）由来のPHA合成酵素遺伝子を発現させ、炭素数5以上のモノマーを含む共重合ポリマーを生産する検討もなされた。この場合も生産されるポリマー含量は0.5%に留まった（非特許文献6参照）。

【0009】

別の検討によれば、PHA合成酵素遺伝子と共に、アセチル-CoAを二量化して3-ヒドロキシブチリル-CoAを合成するβケトチオラーゼ、NADPH依存性還元酵素遺伝子を導入し、菌体重量当たり6.7%のポリマーの蓄積を確認している（非特許文献7）。しかしながら、これらのポリマーは硬くて脆い性質を有するP（3HB）であった。

【0010】

更に、酵母ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）のペルオキソームに、シュードモナス属（*Pseudomonas aeruginosa*）由来のPHA合成酵素遺伝子を配向発現させ、オレイン酸を炭素源としてポリエステルを生産させる検討もなされている。この研究によれば乾燥菌体当たり1重量%のポリマーを蓄積することが示されている（非特許文献8参照）。しかしこの程度のポリマー生産性では、工業的生産のためには全く不十分である。

【0011】

酵母は増殖が早く菌体生産性が高いことで知られている。その中でもキャンディダ（*Candida*）属に属する酵母は過去Single Cell Proteinとして注目され、ノルマルバラフィンを炭素源とした飼料用菌体生産が研究されてきた。また、近年キャンディダ（*Candida*）属の宿主ベクター系が開発され、遺伝子組換え技術を用いた物質生産が報告されている（非特許文献9参照）。キャンディダ・ユーティリス（*Candida utilis*）を宿主としたαアミラーゼの生産性は約12.3g/Lと高く、このように高い物質生産能力を有するキャンディダ（*Candida*）属は、ポリマー生産用宿主として期待される。さらに、細菌と比べて菌体と培養液との分離が容易であることから、ポリマーの抽出精製工程をより簡単にすることも可能である。

そこで、優れた物性を有するP（3HB-co-3HH）をキャンディダ（*Candida*）属酵母などを用いて生産する方法が開発されているが、ポリマー生産性の点で更に改良を加える必要があった（特許文献6参照）。菌体当たりのポリマー生産量を向上させる方法の一つとして、PHA合成に関与する酵素遺伝子の菌体内発現量を増加させる方法が想定された。

【0012】

酵母の菌体内で自律複製の可能な遺伝子であるベクターは、1細胞に1コピー程度存在する型（YCP型）と、多コピー存在しうる型（YRp型）がそれぞれの酵母種に対して開発されつつある。キャンディダ・マルトーサにおいてもM. Kawamuraにより自

律的複製に関わる配列（Autonomously replicating sequence：以下ARSと略す）およびセントロメア配列（以下CENと略す）を含む高効率形質転換の原因領域（Transformation ability：以下TRAと略す）が見出され（非特許文献10参照）、TRA全領域を有する安定性の高い低コピーベクターと、導入遺伝子高発現が期待できるCEN領域を除いた高コピー数ベクターが開発されている（非特許文献11参照）。しかしながら、キャンディダ・マルトーサなどの高コピーベクターは安定性に問題があり、産業上有利に利用することができない。従って、高コピー数ベクターを利用してPHA合成に関与する酵素遺伝子の菌体内発現量を増加させることでポリマー生産性を向上させることは困難であった。

【0013】

また、PHA合成に関与する酵素遺伝子の菌体内発現量を増加させる方法としては、当該遺伝子を発現させるプロモーターを強力なものにする方法が考えられる。キャンディダ・マルトーサにおいて種々のプロモーターがクローニングされている。解糖系の酵素として知られているホスホグリセリン酸キナーゼ（以下PGKと略す）のプロモーターは、グルコースの存在下で強力な遺伝子発現を誘導することが知られている。更に、ガラクトース存在下において強力な遺伝子発現誘導活性を有するGALプロモーターもクローニングされている（非特許文献12参照）。しかしながら、一例としてP(3HB-co-3HH)の生産に好適な油脂・脂肪酸あるいはn-アルカン（n-アルカン）を炭素源とした場合に、これらのプロモーターはほとんど機能しない。更にGALプロモーターはガラクトースを炭素源としたときにのみ誘導されることから、高価なガラクトースを利用しなければならない点で工業生産には適さないといえる。

【0014】

キャンディダ・マルトーサはn-アルカン酸化系の酵素をアルカンの存在下に高生産する。特に、アルカンの初発酸化を行うチトクロームP450をコードする遺伝子（以下ALKと略す）が強く誘導される（非特許文献13参照）。しかしながら、これらのプロモーターでもPGKやGALプロモーターと比較するとその活性は低い。更に、構成的に発現するアクチン合成酵素1遺伝子（以下ACT1と略す）などのプロモーターは、活性として十分な強度を有しているとは言えない。一例としてP(3HB-co-3HH)の生産に好適な油脂・脂肪酸あるいはn-アルカンを炭素源とした場合、現在の所、ALK2プロモーターの上流にARR（アルカンレスポンシブルリージョン）配列を複数個附加することによりプロモーター活性を向上させたARRプロモーター（非特許文献14参照）より強力なプロモーターは開発されておらず、従って、PHA合成に関与する酵素遺伝子の菌体内発現量を増加させる方法として強力なプロモーターを利用することは現実的でない。

【0015】

これとは別に、ベクターにPHA合成に関与する酵素遺伝子の発現ユニットを多数導入する方法なども考えられるが、酵母でもベクターを用いて遺伝子を導入する場合には、導入遺伝子の大きさに制限を受けることが知られており、あまりにも大きなサイズの遺伝子を含むベクターは、作製上の困難さ、酵母への導入効率、酵母中での安定性などの点で産業上現実的とは言い難い。

【0016】

また、遺伝子を增幅することにより、目的酵素活性を増加させる方法が報告されている（非特許文献15参照）。これは、シクロヘキシミド感受性の酵母に対して、シクロヘキシミド耐性遺伝子と目的遺伝子を連結して導入し、シクロヘキシミド高濃度耐性株を取得することにより目的遺伝子高発現株を取得している。しかしながら、キャンディダ・マルトーサはシクロヘキシミド耐性を有していることが知られており、シクロヘキシミド耐性遺伝子を利用したこのような遺伝子増幅により、PHA合成に関与する酵素遺伝子の菌体内発現量を増加させることは困難である。

【0017】

そこで、上記の問題を回避して、キャンディダ・マルトーサにおいてPHA合成に関与す

る酵素遺伝子の菌体内発現量を増加させ、生分解性ポリエステルを高生産させる方法の開発が望まれていた。

【0018】

更に、一般的にポリエステルの分子量が物性や加工性に大きな影響を与えることが知られている。微生物におけるP H A生産においては、菌体当たりの酵素の分子数を過度に増すと基質律速状態となり、生産されるポリマーの分子量低下が起こることが知られている（非特許文献16、17参照）。従って、菌体内に生産されるポリエステルの分子量を制御する方法の開発が望まれていた。また生産されるポリエステルが、共重合体である場合、モノマー組成が物性や加工性に大きく影響を与えることも知られている。このため、共重合ポリエステルのモノマー組成を制御する方法の開発も望まれていた。

【0019】

また、P H A高生産株の育種のためにはP H A合成に関する酵素遺伝子の菌体内発現量を増加させる必要があり、当該遺伝子群を導入した形質転換株の生産するP H Aの生産性及び物性を考慮しながら、更に同遺伝子群の導入が必要な場合がある。通常、形質転換株の取得においては、薬剤耐性や栄養要求性などのマーカーが利用されている。このため、遺伝子導入回数に応じたマーカーの種類が必要であるが、現在までに開発された複数の遺伝子マーカーを有するキャンディダ・マルトーサは、その生育速度において野性株と比較して大きく劣っており、P H A生産株としての利用が困難であった（非特許文献18参照）。また、一種類の遺伝子マーカーを有する生育速度の改善されたキャンディダ・マルトーサも開発された（特許文献7参照）。しかしながら、本株に野性株と同等の生育速度を保持させながら、更に複数の遺伝子マーカーを付与することは、同酵母が2倍体のゲノムを有していることから困難と考えられた。

【0020】

- 【特許文献1】特開昭57-150393号公報
- 【特許文献2】特開昭59-220192号公報
- 【特許文献3】特開平5-93049号公報
- 【特許文献4】特開平7-265065号公報
- 【特許文献5】特開平10-108682号公報
- 【特許文献6】WO00/43525号パンフレット
- 【特許文献7】特開2002-209574号公報
- 【非特許文献1】M. Lemoigne, Ann. Inst. Pasteur, 39, 144 (1925)
- 【非特許文献2】Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, Macromolecules, 28, 4822-4823 (1995)
- 【非特許文献3】T. Fukui, Y. Doi, J. Bacteriol., vol. 179, No. 15, 4821-4830 (1997)
- 【非特許文献4】T. Fukui等, Appl. Microbiol. Biotechnol., 49, 333 (1998)
- 【非特許文献5】Microbiology, vol. 142, pp 1169-1180 (1996)
- 【非特許文献6】Poirier Y. 等, Appl. Microbiol. Biotechnol., 67, 5254-5260 (2001)
- 【非特許文献7】Breuer U. 等, Macromol. Biosci., 2, pp 380-386 (2002)
- 【非特許文献8】Poirier Y. 等, FEMS Microbiology Lett., vol. 207, pp 97-102 (2002)
- 【非特許文献9】化学と生物, vol. 38, No 9, 614 (2000)
- 【非特許文献10】M. Kawamura, et al., Gene, vol. 24, 157, (1983)
- 【非特許文献11】M. Ohkuma, et al., Mol. Genet.

., v o l . 2 4 9 , 4 4 7 , (1 9 9 5)

【非特許文献12】 S . M . P a r k , et al . , Ye a s t , v o l . 1 3 , 2 1 (1 9 9 7)

【非特許文献13】 M . O h o k u m a , et al . , D N A and C e l l B i o l o g y , v o l . 1 4 , 1 6 3 , (1 9 9 5)

【非特許文献14】 木暮ら, 2 0 0 2 年日本農芸化学大会講演要旨集, p 1 9 1

【非特許文献15】 K . K o n d o , et al . , N a t . B i o t e c h n o l . , v o l . 1 5 , p p 4 5 3 - 4 5 7 (1 9 9 7)

【非特許文献16】 S i m S . J . 等, N a t u r e B i o t e c h n o l o g y , v o l . 1 5 , p p 6 3 - 6 7 (1 9 9 7)

【非特許文献17】 G e r n g r o s s T . U . , M a r t i n D . P . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , v o l . 9 2 , p p 6 2 7 9 - 6 2 8 3 (1 9 9 5)

【非特許文献18】 K a w a i S . 等, A g r i c . B i o l . C h e m . , 5 5 : 5 9 - 6 5 (1 9 9 1)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 2 1】

本発明は、上記現状に鑑み、P H A合成に関与する遺伝子の発現カセットを酵母に複数形質転換した形質転換体、および得られた形質転換体を培養することにより、生分解性かつ優れた物性を有するP (3 H B - c o - 3 H H) 等のポリエステルを製造する方法を提供するものである。また、同微生物の育種方法も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0 0 2 2】

本発明者等は、上記課題を解決すべく銳意研究を重ねた結果、遺伝子組換えの手法を駆使することにより、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子（以下、p h a Cと略記する）とアセトアセチルC o A還元酵素遺伝子（E C 1 . 1 . 1 . 3 6 ）（以下、p h b Bと略記する）をキヤンディダ・マルトーサの遺伝子破壊株に複数導入した形質転換体を作製した。これにより、生分解性ポリエステルとして有用性のある3-ヒドロキシブチレート（以下、3 H Bと略記する）と3-ヒドロキシヘキサノエート（以下、3 H Hと略記する）との2成分共重合ポリエステル（以下、P (3 H B - c o - 3 H H) と略記する）を効率的に生産することに成功した。

本発明は、ポリエステル生合成に関与する遺伝子を複数導入した転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、上記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取するポリエステルの製造方法である。さらに、本発明は生産されるポリエステルの物性が制御されたポリエステルの製造方法である。また、本発明は遺伝子導入に使用する選択マーカーの効率的な回復方法にも関する。

【0 0 2 3】

すなわち、本発明は、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子とアセトアセチルC o A還元酵素遺伝子とが導入されている酵母形質転換体であって、これらの遺伝子の両方又は何れかが2コピー以上導入されていることを特徴とする酵母形質転換体である。

本発明は、また、上記酵母形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、上記酵母形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法である。

本発明は、また、上記酵母形質転換体を用いるポリエステルの製造において、酵母形質転換体のアセトアセチルC o A還元酵素遺伝子の数を制御することによりポリエステルの分子量を制御する方法である。

本発明は、また、上記酵母形質転換体を用いるポリエステルの製造において、酵母形質転換体のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子の数を制御することによりポリエステルのヒドロキシアルカン酸組成を制御する方法である。

本発明は、また、選択マークー遺伝子を持つキャンディダ・マルトーサで分子内相同組換えを行うことにより、当該選択マークー遺伝子を除去することを特徴とする選択マークーの回復方法である。

以下、本発明について詳細に説明する。

【0024】

(0) 用語の説明

相同的組換えとは、DNAの塩基配列が類似の配列又は同じ配列（相同配列）を持つ部分で起こる組換えを示す。

分子内相同組換えとは、染色体中に存在する相同配列部分で起こる組換えを示す。

遺伝子導入用DNAとは、微生物細胞内で染色体上の遺伝子と相同的組換えを起こすことができ、それによって目的遺伝子を挿入できるDNAを示す。

遺伝子破壊とは、ある遺伝子の機能が発揮できないようにするために、その遺伝子の塩基配列に変異を入れる、別のDNAを挿入する、あるいは、遺伝子のある部分を欠失させることを示す。遺伝子破壊の結果、その破壊された遺伝子がmRNAへ転写できなくなり、構造遺伝子が翻訳されない、あるいは、転写されたmRNAが不完全なため、翻訳された構造蛋白質のアミノ酸配列に変異又は欠失が生じ、本来の機能の発揮が不可能になる。

【0025】

ADE1遺伝子とは、プロモーター領域を含む5'非翻訳領域とホスホリボシルアミノイミダゾールーサクシノカルボキサミド合成酵素(EC6.3.2.6)をコードする領域並びにターミネーター領域を含む3'非翻訳領域からなる遺伝子断片を示す。キャンディダ・マルトーサのADE1遺伝子の塩基配列はGenBank:D00855に公開されている。

URA3遺伝子とは、プロモーター領域を含む5'非翻訳領域とオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシレース(EC4.1.1.23)をコードする領域並びにターミネーター領域を含む3'非翻訳領域からなる遺伝子断片を示す。キャンディダ・マルトーサのURA3遺伝子の塩基配列はGenBank:D12720に公開されている。

HIS5遺伝子とは、プロモーター領域を含む5'非翻訳領域とヒスチジノール-ホスフェート-アミノトランスフェラーゼ(EC2.6.1.9)をコードする領域並びにターミネーター領域を含む3'非翻訳領域からなる遺伝子断片を示す。キャンディダ・マルトーサのHIS5遺伝子の塩基配列はGenBank:X17310に公開されている。

【0026】

ADE1DNA断片とは、微生物細胞内で染色体上のADE1遺伝子と相同的組換えを起こすことができ、それによってADE1遺伝子を破壊できるDNAを示している。

URA3DNA断片とは、微生物細胞内で染色体上のURA3遺伝子と相同的組換えを起こすことができ、それによってURA3遺伝子を破壊できるDNAを示している。

HIS5DNA断片とは、微生物細胞内で染色体上のHIS5遺伝子と相同的組換えを起こすことができ、それによってHIS5遺伝子を破壊できるDNAを示している。

【0027】

同種遺伝子とは、宿主酵母の染色体上に存在している遺伝子またはその一部のDNAを意味する。

異種遺伝子とは、宿主酵母の染色体上に本来存在しない遺伝子またはその一部のDNAを意味する。

遺伝子発現カセットとは、転写プロモーターDNA配列、発現を目的とする遺伝子をコードするDNA、及び転写を終結するターミネーターを含むDNAから構成されるDNAで、環状プラスミド状のもので染色体外で機能するものと、染色体DNAに組み込むタイプがある。

【0028】

PHAとは、ポリヒドロキシアルカン酸の略であり、3-ヒドロキシアルカン酸を共重合した、生分解性ポリエステルを示している。

phacとは、3-ヒドロキシアルカン酸を共重合して生分解性ポリエステルを合成する

ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子を示している。

p h b B とは、アセトアセチル Co A を還元して 3-ヒドロキシブチリル Co A を合成するアセトアセチル Co A 還元酵素遺伝子を示している。

【0029】

(1) 宿主

本発明でいう酵母としては、複数の遺伝子を形質転換できればよく、菌株の寄託機関（例えば IFO、ATCC 等）に寄託されている酵母等を使用することができる。好ましくは、直鎖炭化水素の様な疎水性物質に耐性を有する点で、*Candida* 属 (*Candida* 属)、*Clavispora* 属 (*Clavispora* 属)、*Cryptococcus* 属 (*Cryptococcus* 属)、*Debaromyces* 属 (*Debaromyces* 属)、*Lodderomyces* 属 (*Lodderomyces* 属)、*Pichia* 属 (*Pichia* 属)、*Rodotorula* 属 (*Rodotorula* 属)、*Sporidiobolus* 属 (*Sporidiobolus* 属)、*Stephanosascus* 属 (*Stephanosascus* 属)、*Yarrowia* 属 (*Yarrowia* 属)などの酵母を使用することができる。

これら酵母の中でも、特に、染色体遺伝子配列の解析が進んでおり、宿主-ベクター系も利用できること、また、直鎖炭化水素や油脂等の資化能力が高い点で、*Candida* 属が好ましい。

【0030】

Candida 属の中でも、特に直鎖炭化水素や油脂等の資化能力が高い点で *albicans* 種、*ancudensis* 種、*atmosphaerica* 種、*azyma* 種、*berたe* 種、*blankii* 種、*butyri* 種、*conglobata* 種、*dendronema* 種、*ergastensis* 種、*fluviatilis* 種、*friedrichii* 種、*gropengesserii* 種、*haemulonii* 種、*incommunis* 種、*insectrum* 種、*laureliae* 種、*maltosa* 種、*meliibiosica* 種、*membranifaciens* 種、*mesenterica* 種、*natalensis* 種、*oregonensis* 種、*palmioleophilia* 種、*parapsilos* 種、*pseudointermedia* 種、*querцитrusa* 種、*rhyagii* 種、*rugosa* 種、*saitoana* 種、*sake* 種、*schattavia* 種、*sequanensis* 種、*shehatae* 種、*sorbophilica* 種、*tropicalis* 種、*valdiviana* 種、*viswanathii* 種を用いることが好ましい。

これらの種の中でも、増殖速度や感染性の点から特にマルトーサ (*maltosa*) 種が好ましい。

【0031】

本発明の酵母形質転換体の作製において、形質転換する際に、薬剤耐性や栄養要求性等の性質を有する選択マーカー遺伝子も同時に宿主に導入しておけば、形質転換後にその選択マーカー遺伝子が発現することによる薬剤耐性や栄養要求性等を利用して形質転換株のみを選択することができる。

選択マーカー遺伝子としては、シクロヘキシミドや G 4 1 8、ハイグロマイシン B などへの耐性を付与する遺伝子を用いることができる。また、栄養要求性を相補する遺伝子を選択マーカーとして用いることもできる。これらは、単独で使用してもよいし、組み合わせて使用することもできる。

【0032】

しかしながら、例えば、栄養要求性を相補する遺伝子を選択マーカー遺伝子として用いる場合は、その選択マーカー遺伝子と同様の作用をする、宿主が元来有する遺伝子が実質的に機能しない栄養要求性破壊株が必要である。このような栄養要求性破壊株（変異株）は、ニトロソグアジニンやエチルメタンスルホン酸などの変異源を用いたランダム変異誘起処理によって取得することができるが、変異が目的の箇所以外にも入っている可能性が高く、その結果生育速度等に影響を受ける場合があることから、本発明においては、相同的組換による遺伝子破壊法によって作製された宿主を用いる方が好ましい。

なお、複数回形質転換を行う場合は、その回数に応じたマーカーの種類が必要である。又は、後述のように、選択マーカー遺伝子を含む遺伝子導入用DNAを宿主に導入したのち、選択マーカー遺伝子を除去することにより、選択マーカーを回復する必要がある。本発明の実施例においては、多重栄養要求性遺伝子破壊株を用いた。

【0033】

本発明の実施例で用いた、ADE1、HIS5及びURA3遺伝子破壊株であるキャンディダ・マルトーサAHU-71株は、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、ブダペスト条約に基づいて国際寄託されているキャンディダ・マルトーサAC16株（受託日：平成12年11月15日、受託番号：FERM BP-7366）を使用し、後述の実施例2に記載の方法で作製した。キャンディダ・マルトーサAHU-71株は、P-19492の受託番号で、平成15年8月15日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに国内寄託されている。

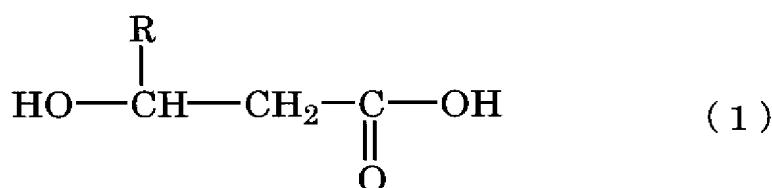
特に上記宿主において、複数回形質転換を行う際、栄養要求性等の遺伝子破壊を行わなくても初めから複数の選択マーカー遺伝子を利用できるものの場合は、効率的に本発明の酵母形質転換体を作製することができる。

【0034】

(2) PHA合成酵素遺伝子とアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子
PHA合成酵素遺伝子としては特に限定されないが、上記一般式(1)

【0035】

【化1】

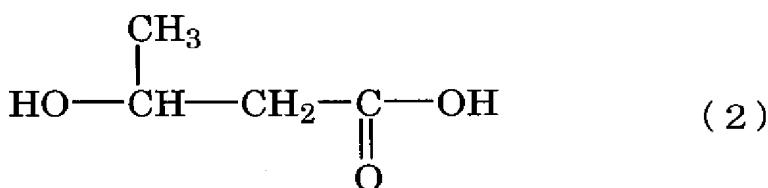


【0036】

(式中、Rは、炭素数1～13のアルキル基を表す。)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを合成する合成酵素遺伝子が好ましく、下記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)の合成酵素遺伝子であることがより好ましい。

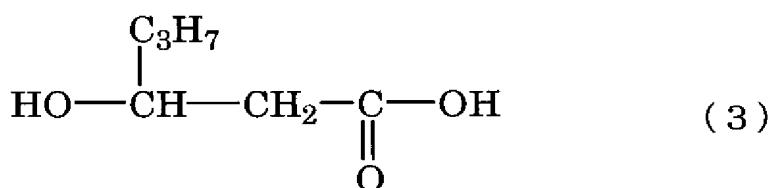
【0037】

【化2】



【0038】

【化3】



【0039】

上記PHA合成酵素遺伝子として、例えば、特開平10-108682号公報に記載されているPHA合成酵素遺伝子を用いることができる。

また、本発明においては、上記PHA合成酵素遺伝子と共に、アセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子を用いる。アセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子としては、アセトアセチル-CoAを還元し、(R)-3-ヒドロキシブチリル-CoAを合成する活性を有している酵素遺伝子であればよく、例えば、ラルストニア・ユートロファ(GenBank: AAA21973)、シュードモナスsp. 61-3(GenBank: T44361)、ズーグロエア・ラミゲラ(GenBank: P23238)、アルカリジエネス・ラタスSH-69(GenBank: AAB65780)由来の酵素遺伝子などが利用できる。

更に、上記遺伝子に加えて、他のPHA合成に関与する遺伝子を用いることができる。他のPHA合成に関与する遺伝子としては、たとえば、 β 酸化経路の中間体のエノイル-CoAを(R)-3-ヒドロキシアシル-CoAに変換する(R)体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ(Fukui T. 等、FEMS Microbiology Letters 170: 69-75(1999)、特開平10-108682号公報)や、アセチル-CoAを二量化して3-ヒドロキシブチリル-CoAを合成する β ケトチオラーゼ(Peoples OP等、J. Biol. Chem. 264: 15298-15303(1989))、3-ケトアシル-CoA-アシルキャリアープロテイン還元酵素遺伝子(Taguchi K. 等、FEMS Microbiology Letters 176: 183-190(1999))などが挙げられる。特に、(R)-3-ヒドロキシヘキサノイル-CoAを合成する活性を有している酵素遺伝子が好ましい。

【0040】

本発明は、PHA合成酵素遺伝子(phac)とアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子(phbB)を同時に用いるものである。

本発明では、アエロモナス・キャビエ由来のphac(特開平10-108682公報、Fukui T. 等、FEMS Microbiology Letters 170: 69-75(1999))とラルストニア・ユートロファ由来のphbB(GenBank: J04987)を用いることができ、上記phacとしては、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるアエロモナス・キャビエ由来の酵素又は変異体をコードするものが好ましく、上記phbBとしては、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるラルストニア・ユートロファ由来の酵素又は変異体をコードするものが好ましい。

これらの遺伝子は、実質的な酵素活性を有する限り、当該遺伝子の塙基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じていても良いものとする。但し、異種遺伝子の場合、宿主酵母内で機能を持つ蛋白質に効率的に翻訳されるという保証はないため、アミノ酸コドンを最適化することが望ましい。

【0041】

特に、本発明の宿主に用いるキャンディダ・マルトーサ等の一部のキャンディダ属酵母においては、mRNAから蛋白質が翻訳される段階で、一部コドンの翻訳のされ方が他の生物と異なっていることが知られている。キャンディダ・マルトーサではロイシンコドンのCUGがセリンに翻訳されるため(Ohama T. 等、Nucleic Acid Res. 21: 40394045(1993))、大腸菌由来lacZ遺伝子が、活性を持つ β ガラクトシダーゼに翻訳されない(Sugiyama H. 等、Yeast 11: 43-52(1995))。このように異種遺伝子を発現させる場合には、それがキャンディダ・マルトーサ内で機能を持つ蛋白質に翻訳されるという保証はない。従って、キャンディダ・マルトーサを宿主として異種遺伝子を発現させる場合、原則としてロイシンコドン(CUG)のみ変換することが好ましく、さらに効率よく発現させるため他のアミノ酸コドンをキャンディダ・マルトーサのものに合わせても良い。コドンの変換は、例えばWolf K. 編 Nonconventional Yeasts in Biotechnology. の中のMauersberger S. 等著、Candida m

a l t o s a p 5 2 4 - 5 2 7 を参考にして行えは良い。

【0042】

PHA合成酵素遺伝子は、アミノ酸配列を改変し、酵素活性・基質特異性・熱安定性などの性質の改良された変異体を取得・作製し利用することができる。有用な変異の方法は種々知られているが、特に分子進化工学的手法（特開2002-199890号公報）などが、迅速に所望の変異体を得られることから有用性が高い。これらの手法を利用して、過去、いくつかの合成酵素変異体が見出され、大腸菌において野生型酵素より活性が向上することが確認されている（T. Kichise等 App1. Environ. Microbiol. 68, 2411-2419 (2002)、Amaraa A. A. 等 App1. Microbiol. Biotechnol. 59, 477-482 (2002)）。

【0043】

また、コンピュータ上で酵素遺伝子の立体構造、または予想される立体構造を基に、有用なアミノ酸変異を特定することも、例えばプログラムShrike（特開2001-184831）などを用いて可能である。本発明におけるphacとしては、例えば、アエロモナス・キャビエ由来のPHA合成酵素遺伝子のアミノ酸配列に、これらの手法を利用して得られる、以下の(a)～(h)いずれかのアミノ酸置換を少なくとも一つ以上行ったPHA合成酵素変異体をコードするものを用いることができる。

- (a) Asn-149をSer
- (b) Asp-171をGly
- (c) Phe-246をSerまたはGln
- (d) Tyr-318をAla
- (e) Ile-320をSer、AlaまたはVal
- (f) Leu-350をVal
- (g) Phe-353をThr、SerまたはHis
- (h) Phe-518をIle

【0044】

ここで、例えば、「Asn-149」というのは、配列番号1のアミノ酸配列において149番目のアスパラギンを意味し、(a)のアミノ酸置換は149番目のアスパラギンをセリンに変換することを意味する。

【0045】

本発明においては、アエロモナス・キャビエ由来のphacを、キャンディダ・マルトーサで発現するように設計し、且つアミノ酸配列上アミノ末端より149番目に存在するアスパラギンをセリンに置換するように作製したDNA(phac149NSと略す)の塩基配列を配列番号4に示す。また、ラロストニア・ユートロファ由来のphbBをキャンディダ・マルトーサで発現するように設計したDNAの塩基配列を、配列番号5に示す。

本発明におけるphac、phbBは、配列番号4、5のものに限定されず、当該酵素遺伝子のアミノ酸配列がキャンディダ・マルトーサ内で発現される塩基配列であれば、いかなる塩基配列でも用いることができる。

【0046】

phac、phbBを細胞質基質（サイトゾル、cytosol）で発現させる場合にはこのまま用いるが、これらの遺伝子をペルオキシソームに局在させる遺伝子に改変して使用することもできる（WO03/033707）。

phac、phbBをペルオキシソームに局在させるためには、これらの酵素遺伝子のカルボキシル末端にペルオキシソーム配向シグナルとして3つのアミノ酸配列から成る「(セリン/アラニン/システイン)-(リジン/アルギニン/ヒスチジン)-ロイシン」が付加された配列をコードする遺伝子を用いることができる。ここで、例えば、(セリン/アラニン/システイン)とはセリン、アラニンまたはシステインのいずれかであるということを意味する。

【0047】

また、N末端付近に存在する9つのアミノ酸配列「(アルギニン／リジン) (ロイシン／バリン／イソロイシン) (5アミノ酸) (ヒスチジン／グルタミン) (ロイシン／アラニン)」もペルオキシソーム配向シグナルとして知られている。これらの配列をコードするDNAをPHA合成に関与する遺伝子に挿入、付加することによっても、同酵素遺伝子をペルオキシソームに局在させることができる。

【0048】

更に、ミトコンドリアでph aC、ph bBが発現するように、これらの遺伝子をミトコンドリアに配向させる遺伝子に改変し使用することもできる。これらの遺伝子をミトコンドリアに局在させるためには、アミノ末端にミトコンドリアに局在的して発現している蛋白質を結合させればよい。例えばチトクロームオキシダーゼやTCAサイクル関連酵素などが挙げられる。ミトコンドリアに局在的して発現している蛋白質のアミノ末端から15残基以上、望ましくは40残基以上をコードする遺伝子を、PHA合成に関与する遺伝子の5'側上流にフレームがずれないように結合させた遺伝子を用いればよい。この時付加する融合遺伝子とPHA合成に関与する遺伝子の間にアミノ酸残基の不必要的衝突を避けるためのリンカー配列を挿入することもできる。融合遺伝子に使用する遺伝子は、本発明の形質転換に用いる宿主酵母由来のものが好ましいが、特に限定されるものではない。

【0049】

これら、サイトゾル、ペルオキシソーム、ミトコンドリアに配向するように設計された遺伝子は単独で用いることもできるが、二種以上を用いることもできる。ph aC、ph bBとしては、ペルオキシソーム配向シグナルが付加されているものが好ましい。

【0050】

(3) 遺伝子発現カセット

本発明に用いるPHA合成酵素遺伝子とアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子の発現カセットは、当該遺伝子の5'側上流にプロモーター、5'上流域活性化配列(UAS)等のDNA配列を連結し、当該遺伝子の3'下流にポリA付加シグナル、ターミネーター等のDNA配列を連結して作製することができる。

本発明においては、PHA合成酵素遺伝子とアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子に、酵母で機能するプロモーター及びターミネーターが接続されていることが好ましい。

【0051】

使用するプロモーター、ターミネーターは酵母で機能するものであればどのような配列でも利用できる。プロモーターには構成的に発現を行うものや誘導的に発現を行うものがあるが、いずれのプロモーターも用いてもよい。上記プロモーターとしては、形質転換体の培養に用いる炭素源に強い活性を持つプロモーターが好ましい。例えば、油脂などを炭素源として用いる場合にはプロモーターとしてはキャンディダ・マルトーサのALK1遺伝子(GenBank D00481)のプロモーターALK1p(WO01/88144)、ALK2遺伝子(GenBank X55881)のプロモーターALK2p等を用いることができる。更に、これらのプロモーターの上流にARR(アルカンレスポンシブルリージョン)配列を複数個付加することによりプロモーター活性を向上させたプロモーター(木暮ら、2002年日本農芸化学大会講演要旨集、p191)を利用することもできる(配列番号6)。

【0052】

また、ターミネーターとしてはキャンディダ・マルトーサのALK1遺伝子のターミネーターALK1t(WO01/88144)等を用いることができる。なお、上記プロモーター及び/又はターミネーターの塩基配列は、使用宿主で機能する配列であれば、1つ若しくは複数個の塩基が欠失、置換及び/又は、付加された塩基配列であってもよい。

本発明においては、上記プロモーター、ターミネーターが、キャンディダ属で機能するものであることが好ましく、キャンディダ・マルトーサで機能するものであることがより好ましく、上記プロモーター、ターミネーターがキャンディダ・マルトーサ由来であることが更に好ましい。

【0053】

本発明の好ましい形態において、上記プロモーターは、ペルオキシソーム配向シグナルをコードするDNAが付加されたPH A合成酵素遺伝子、並びに、ペルオキシソーム配向シグナルをコードするDNAが付加されたアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子の5'、上流にそれぞれ連結され、ターミネーターは、ペルオキシソーム配向シグナルをコードするDNAが付加されたPH A合成酵素遺伝子、並びに、ペルオキシソーム配向シグナルをコードするDNAが付加されたアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子の3'、下流に、それぞれ連結される(WO 03/033707)。

【0054】

プロモーターとターミネーターとをph a C、ph b Bに連結し、本発明の遺伝子発現カセットを構築する方法は、特に限定されるものではない。本実施例の方法の他にも、制限酵素部位を作製するためにPCR法も利用できる。例えば、WO 01/88144に記載の方法が使用できる。

【0055】

(4) 形質転換体

上記発現カセットの酵母1細胞当たりの導入数は、本発明における望ましい形態において用いたARRプロモーターを利用した場合であっても、炭化水素や脂肪酸・油脂等の炭素源下で強く遺伝子発現が誘導されるものの1個では不十分であり、ph a Cの発現カセットの数とph b Bの発現カセットの数は、何れかが2個以上必要であることが本発明により示された。宿主のPH A合成の基質供給量が律速とならない限り導入する発現カセットの数に制限はなく、多い方が望ましい。好ましい発現カセット数は、用いるプロモーターの種類にもよるが、プロモーターARRpを用いた場合、共に2個以上導入することが好ましく、共に3個以上導入することがより好ましい。

この発現カセットは、酵母内において自律複製可能なベクターに挿入して宿主酵母に導入することができる。また、宿主酵母染色体に挿入することもできる。両導入法は同時に用いることもできる。

【0056】

ベクターを用いて宿主酵母に導入する場合は、例えば、キャンディダ・マルトーサにおいて自律増殖可能なpUTU1(M. Ohkuma, et al J. Biol. Chem., vol. 273, 3948-3953(1998))などのベクター中に発現カセットを複数挿入した発現ベクターを作製すればよい。

【0057】

発現カセットを染色体に挿入する方法を用いる場合は、例えば、相同的組換えが利用できる。相同的組換えの中でも、自然復帰しない導入株が取得できるという点で、遺伝子置換法が好ましい。遺伝子置換法による発現カセットの染色体への挿入には、まず発現カセットと選択マーカーとなる遺伝子を結合させ、次いで発現カセットと選択マーカーとなる遺伝子を結合させたDNAの両端に、導入する染色体上の遺伝子と相同な配列を持つ遺伝子断片を結合させたDNA(遺伝子導入用DNA)を用いることができる。

【0058】

発現カセットなどを挿入させる染色体上の部位は、宿主に回復不可能な影響を与えない限り、特に制限はない。遺伝子導入用DNAの両端に結合させた、導入する染色体上の遺伝子との相同性領域長は、好ましくは10塩基以上、より好ましくは200塩基以上、更に好ましくは300塩基以上である。また、両端それぞれの相同性は、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上である。即ち、遺伝子配列の解析されている部位においては、当該遺伝子をそのまま利用することができるし、遺伝子配列が未知であっても遺伝子配列の知られた近縁種酵母の染色体遺伝子配列を利用することができる。

【0059】

相同性が低く相同組換えが起こりにくい場合には、染色体上の導入部位の遺伝子をクローニングして使用することができる。染色体上の導入部位の遺伝子をクローニングするためには、染色体遺伝子の全配列が解析されているサツカロマイセス・セレビシエや、キャンディダ・アルビカンスの配列を元にPCR用プライマーを設計し遺伝子增幅を行えばよい

。また、導入対象酵母染色体DNAライブラリーより、サッカロマイセス・セレビシエや、キャンディダ・アルビカンスの相同遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼイション法を用いて取得することもできる。プローブは、PCRなどを用いて作製できる。染色体DNAライブラリーは、当業者にとって公知の方法で作製できる。

遺伝子導入用DNA中の発現カセットの数には限定が無く、作製可能であればいくつでもよい。

【0060】

遺伝子導入用DNA中の選択マーカー遺伝子としては、上述のように栄養要求性を相補する遺伝子を選択マーカー遺伝子として用いることができる。また、シクロヘキシミドやG418あるいはハイグロマイシンBなどの耐性を付与する遺伝子を用いることもできる。これらの選択マーカー遺伝子は、後述の分子内相同組換えにより自然欠失可能な形態にして利用する事も可能である。この場合、選択マーカー遺伝子の回復が可能であるので、何度も同じ選択マーカー遺伝子を用いた遺伝子導入用DNAを導入することができ、形質転換株の作製を簡便に行うことができる。

【0061】

これらの発現カセットを酵母宿主に導入するための遺伝子導入用DNAは、大腸菌などにおいて自律増殖するプラスミドなどを用いて、当業者に公知の方法で作製することができる。一例としては、後述の実施例1に記載のURA3破壊用DNA-1中に選択マーカー遺伝子としてHIS5遺伝子を挿入し、URA3遺伝子断片部位との間にphacの発現カセット及びphbBの発現カセットを挿入すると、ヒスチジン要求性をマーカーとして、酵母染色体上のURA3部位に特異的に目的遺伝子を挿入させる遺伝子導入用DNAを作製することができる。

【0062】

遺伝子導入用DNAを含むプラスミドは、適当な大腸菌、例えばJM109やDH5 α に導入し、該大腸菌を培養し、塩化セシウム超遠心法により高純度のプラスミドを大量調製することができる(Sambrook等編、Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 1.42-1.47, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。また、アルカリ法(Brinboim H. C., 等 Nucleic Acids Res. 7:1513-1523 (1979))や市販のプラスミド精製キットなどを用いても十分可能である。このプラスミドを直接酵母の形質転換に用いることができるが、精製したベクターより染色体導入領域を含む相同性のある部分を適当な制限酵素で切り出し、それを遺伝子導入用DNAとして利用するのが望ましい。PCR法を用いて増幅して使用することも可能である。

【0063】

酵母の形質転換法には、プロトプラスト法、酢酸リチウム法(Takagi M. 等、J Bacteriol. 167:551-5 (1986))、電気パルス法(Kasusuke A. 等 Yeast 8:691-697 (1992))等が知られているが、本発明では電気パルス法が好ましい。電気パルス発生には市販の機器が利用できる。本発明では、BTX社(San Diego, CA USA)製のELECTRO CELL MANIPULATOR 600を用いた。キュベットはBIO MEDICAL CORPORATION CO. LTD (Tokyo Japan) 製のBM6200(2mm gap blue cap)を用いた。宿主株よりコンピテント細胞を調製し、遺伝子導入用DNAと共に電気パルス後、選択マーカー遺伝子を含まない形質転換体が増殖しない培地で培養し、出現するコロニーより目的の染色体部位に遺伝子導入用DNAが挿入された株をスクリーニングする。

【0064】

目的遺伝子導入株のスクリーニングは、得られたコロニーから、PCR法やゲノミックサンプルハイブリダイゼーション法(Sambrook等編、Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 9

. 31-9. 57, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)により容易に行うことができる。PCR法では、導入する染色体上の遺伝子の両端をプライマーに用いると、アガロースゲル電気泳動において、野生株では正常な大きさのDNAバンドが検出されるが、導入株では挿入遺伝子に応じたバンドが検出される。しかし、遺伝子が目的以外の箇所、例えは相同性の高い未知の部分に挿入される可能性もあり、その場合、PCR法では確認できない場合がある。この場合、ゲノミックサザンハイブリダイゼーション法や導入する染色体上の遺伝子の相同組換えに用いた部分より外部に存在する遺伝子配列を用いてPCR法を行うことにより確認することが出来る。

【0065】

上記の方法を用いて、ph a C発現カセット及びph b B発現カセットの導入を目的発現カセット数になるまで行うことにより、本発明の形質転換体が作製できる。

【0066】

本発明の実施例で用いた多重栄養要求性遺伝子破壊株を使用する代わりに、野性株や栄養要求性を1つしか持たない株を用いても本発明のPHA合成に関与する遺伝子を複数回導入した酵母形質転換体を取得することができる。例えは、選択マーカー遺伝子として薬剤耐性マーカー遺伝子を用いて遺伝子導入用DNAを導入する場合、形質転換株の選択に用いる薬剤の濃度を、遺伝子導入用DNAで形質転換することに上昇させればよい。また、1回の形質転換後に染色体に導入された選択マーカー遺伝子を除去すれば、再び遺伝子導入のマーカーとして使用することができ、多数の遺伝子導入用DNAを導入することができる。この方法は、例えは特開2002-209574号公報に記載の遺伝子破壊法などが利用できる。更に、選択マーカー遺伝子の両端にhisG遺伝子断片をそれぞれ挿入することで、遺伝子導入を行った後に、分子内相同組換えにより挿入したマーカー遺伝子を除去する事が出来る形に遺伝子導入用DNA作製することもできる(Alani等 Genetics, 116: 541-545 (1987))。

【0067】

本発明で得られたポリエステル生産株の1つであるCM313-X2B株(受託番号: FERM BP-08622)は、2004年2月13日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにブダペスト条約に基づいて国際寄託されている。

【0068】

(5) 選択マーカーの回復方法

本発明の選択マーカーの回復方法は、選択マーカー遺伝子としてADE1遺伝子を持つキヤンディダ・マルトーサで分子内相同組換えを行うことにより、当該ADE1遺伝子を除去することを特徴とするものである。当該ADE1遺伝子を除去することにより、更に形質転換を行う場合、ADE1遺伝子を再び選択マーカー遺伝子として用いることができる。

これまで、サッカロミセス・セレビシエなどで分子内相同組換えにより選択マーカー遺伝子を除去することは公知であったが、キヤンディダ・マルトーサにおいて分子内相同組換えにより選択マーカー遺伝子を除去する方法は、知られていなかった。選択マーカー遺伝子としては、上述のように、薬剤耐性遺伝子や栄養要求性を相補する遺伝子を用いることができ、例えはADE1遺伝子、URA3遺伝子、HIS5遺伝子等が挙げられるが、本発明においては、選択マーカー遺伝子の除去がカラー選択可能なADE1遺伝子を用いる。

本発明の方法においては、ADE1遺伝子に相同的な遺伝子を結合させたものでも分子内相同組換えにより当該ADE1遺伝子を除去することができるが、ADE1遺伝子の上流または下流にADE1遺伝子の一部分を結合させたものの方が、作製が容易であり、余分な遺伝子を酵母染色体に残さない点で好ましい。

選択マーカー遺伝子の分子内相同組換えに用いる遺伝子断片に特に制限はなく、選択マーカー遺伝子が実質的に機能しない遺伝子断片を用いればよい。本発明の実施例においてはADE1遺伝子の5'末端部分の遺伝子断片を用いたが、3'末端部分の遺伝子断片を用

いるものである。選択マーカー遺伝子に連結させるマーカー遺伝子断片は、好ましくは10塩基以上、より好ましくは200塩基以上、更に好ましくは300塩基以上である。即ち、上記(4)に記載の、遺伝子導入用DNA中の選択マーカー遺伝子の5'末端あるいは3'末端にマーカー遺伝子断片を挿入すればよい。本発明の方法において、ADE1遺伝子は、配列番号3で示される塩基配列からなるものが好ましい。配列番号3で示される塩基配列は、c a n d i d a m a l t o s a由来のものである。この方法は、ADE1遺伝子以外のマーカー遺伝子にも応用できる。

図2に分子内相同組換えによるマーカーの回復の模式を示す。図2において、括弧内の数字は、ADE1遺伝子のGeneBankに登録されている配列の5'末端からの番号を示している。

【0069】

分子内相同組換えにより、挿入した選択マーカー遺伝子が除去された株は種々の方法で濃縮・選択することができる。例えば、ナイスタチン濃縮(Snow R. Nature 211: 206-207 (1966))と呼ばれる方法を利用することができます。適当な培地にて培養した菌体を最少培地等に植菌し培養する。菌を洗浄し、窒素源不含最少培地で培養後、窒素源含有最少培地で短時間培養する。この培養液に直接ナイスタチンを添加し、1時間30℃で好気的に培養することにより、マーカー遺伝子を有する株を優先的に殺傷できる。この菌液を適当な寒天培地プレートに塗抹し、30℃で2日間程度培養。除去する選択マーカー遺伝子がアデニン要求性を示すADE1遺伝子である場合は、ADE1遺伝子を破壊すると前駆体物質が蓄積し、酵母が赤く染まるため、アデニン含有最小培地寒天プレートを用いれば赤色コロニーとして得られる。マーカー遺伝子がURA3遺伝子の場合には、ウリジンあるいはウラシルと5-FOA(5-Fluoroorotic acid)の共存下の培地で生育してくるコロニーを選択すればよい。このような選択法がない場合は、レプリカ法を用いることができる。

【0070】

(6) ポリエステルの物性コントロール法

また、本発明のポリエステルの分子量を制御する方法は、酵母形質転換体を用いるポリエステルの製造において、酵母形質転換体のアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子の数を制御することを特徴とするものである。

また、本発明のポリエステルのヒドロキシアルカン酸組成を制御する方法は、酵母形質転換体を用いるポリエステルの製造において、酵母形質転換体のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子の数を制御することを特徴とするものである。

【0071】

すなわち、本発明の目的産物であるポリエステルのヒドロキシアルカン酸組成と分子量は、phaCとphbBの発現量を調節することによってコントロールすることができる。それぞれ同じプロモーターを用いたphaCの発現カセット及びphbBの発現カセットを用いた場合、ヒドロキシヘキサン酸の組成を高くするためには、phbBの発現カセットの導入数に対して、phaCの発現カセットの導入数を高くすることによって行うことができる。また、分子量を増加させるためには、phaCの発現カセットの導入数に対して、phbBの発現カセットの導入数を高くすることによって行うことができる。このような特性を持つ形質転換体は、上述の(4)に記載の方法により作製することができる。また、発現カセットの導入数が同じ場合でも、用いるプロモーターの強さを変えることによって、ヒドロキシアルカン酸組成と分子量の制御を達成できる。

【0072】

(7) 培養精製

本発明のポリエステルの製造方法は、上記酵母形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取することを特徴とするものである。

PHA合成酵素遺伝子及びphbBの発現カセットで形質転換された酵母を培養することによるポリエステルの製造は、次のようにして行うことができる。培養に用いる炭素源としては、酵母が資化できるものであればどのようなものでも良い。また、プロモーターの

発現が誘導型である場合には、適時誘導物質を添加すれば良い。誘導物質が主要炭素源である場合もある。炭素源以外の栄養源としては窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地が使用できる。培養温度はその菌の生育可能な温度であれば良いが、20℃から40℃が好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すれば良い。

【0073】

本発明の好ましい形態としては、上記炭素源として油脂類や脂肪酸類、アルコール類さらにはn-アルカン等を用いることができる。

油脂類としては、例えばナタネ油、ヤシ油、パーム油、パーム核油などが挙げられる。

脂肪酸類としては、例えば、ブタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸などの飽和・不飽和脂肪酸、あるいはこれら脂肪酸のエステルや塩など脂肪酸誘導体が挙げられる。

アルコール類としては、例えば、ブタノール、ヘキサノール、オクタノール、デシルアルコール、ラウリルアルコール、オレイルアルコール等が挙げられる。

n-アルカンとしては、例えば、n-ヘキサン、n-オクタン、n-デカン、n-ドデカン、n-テトラデカン等が挙げられる。

これらを混合して使用することもできる。また、資化ができないかまたは効率よく資化できない油脂の場合、培地中にリバーゼを添加することによって改善することもできる。さらに、リバーゼ遺伝子を形質転換することにより、油脂資化能を付与することもできる。

【0074】

窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。

無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

その他の有機栄養源としてはアミノ酸類、例えばグリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリンなどや、ビタミン類、例えばビタミンB1、ビタミンB12、ビオチン、ニコチン酸アミド、パントテン酸、ビタミンC等が挙げられる。

【0075】

ポリエステルの菌体からの回収は、多くの方法が報告されている。本発明においては、例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液を遠心分離器などで菌体を分離・回収し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この段階に菌体を破碎することもできる。この乾燥菌体をクロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液を濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の資溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。沈殿したポリエステルを濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収することができる。

【0076】

得られたポリエステルの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法などにより行うことができる。重量平均分子量の測定には、GPC法が利用できる。例えば、回収した乾燥ポリマーを、クロロホルム溶解したのち、この溶液をShodex K805L（昭和電工社製）を装着した島津製作所製GPCシステムを用いクロロホルムを移動相として分析する事が出来る。分子量標準サンプルには市販の標準ポリスチレンなどが使用できる。

【発明の効果】

【0077】

本発明により、生分解性かつ優れた物性を有する下記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合ポリエステルを、酵母において効率的に生産することが可能になった。また、酵母において複数回の遺伝子導入を行なうことが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0078】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

酵母菌の培養用に使用した試薬は、特に断らない限り和光純薬から販売されているものを用いた。

【0079】

(培地組成)

L B 培地：10 g/L トリプトン、5 g/L 酵母エキス、5 g/L 食塩。L B プレートの場合は、寒天を16 g/L になるように加える。

Y P D 培地：10 g/L 酵母エキス、20 g/L ポリペプトン、20 g/L グルコース。

Y P D プレートの場合は、寒天を20 g/L になるように加える。アデニン含有Y P D 培地の場合は、アデニンを0.1 g/L 加える。

Y M 培地：3 g/L 酵母エキス、3 g/L マルトエキス、5 g/L バクトペプトン、10 g/L グルコース。

S D 培地：6.7 g/L アミノ酸不含イーストロジエンベース (Y N B)、20 g/L グルコース。アデニン含有培地の場合はアデニンを24 mg/L 添加する。ウリジン含有培地の場合はウリジンを0.1 g/L 添加する。ヒスチジン含有培地の場合はヒスチジンを50 mg/L 添加する。S D プレートの場合は寒天を20 g/L になるように加える。

【0080】

M 培地：0.5 g/L 硫酸マグネシウム、0.1 g/L 食塩、0.4 mg/L チアミン、0.4 mg/L ピリドキシン、0.4 mg/L パントテン酸カルシウム、2 mg/L イノシトール、0.002 mg/L ビオチン、0.05 mg/L 塩化鉄、0.07 mg/L 硫酸亜鉛、0.01 mg/L ホウ酸、0.01 mg/L 硫酸銅、0.01 mg/L ヨウ化カリウム、87.5 mg/L リン酸2水素カリウム、12.5 mg/L リン酸1水素2カリウム、0.1 g/L 塩化カルシウム、20 g/L グルコース。硫酸アンモニウム含有M 培地の場合は、1 g/L 硫酸アンモニウムを加える。硫酸アンモニウム及びアデニン含有M 培地の場合は、M 培地に1 g/L の硫酸アンモニウムと24 mg/L のアデニンを加える。硫酸アンモニウム及びアデニン・ウリジン含有M 培地の場合は、M 培地に1 g/L の硫酸アンモニウムと24 mg/L のアデニンと0.1 g/L のウリジンを加える。硫酸アンモニウム及びアデニン・ヒスチジン含有M 培地の場合は、M 培地に1 g/L の硫酸アンモニウムと24 mg/L のアデニンと50 mg/L のヒスチジンを加える。硫酸アンモニウム及びアデニン・ウリジン・ヒスチジン含有M 培地の場合は、M 培地に1 g/L の硫酸アンモニウムと24 mg/L のアデニンと0.1 g/L のウリジンと50 mg/L のヒスチジンを加える。

【0081】

M 2 培地：12.75 g/L 硫酸アンモニウム、1.56 g/L リン酸2水素カリウム、0.33 g/L リン酸1水素カリウム・3水和物、0.08 g/L 塩化カリウム、0.5 g/L 塩化ナトリウム、0.41 g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、0.4 g/L 硝酸カルシウム・7水和物、0.01 g/L 塩化鉄 (I I I)・4水和物に、2 w/v % バームオイルと塩酸に溶解したトレースエレメント (1 g/mL 硫酸鉄 (I I)・7水和物、8 g/mL 硫酸亜鉛 (I I)・7水和物、6.4 g/mL 硫酸マンガン (I I)・4水和物、0.8 g/mL 硫酸銅 (I I)・5水和物) 0.45 ml/L を添加する。炭素源として、油脂を20 g/L 添加する。

【0082】

酵母の液体培養は、50 ml 試験管、500 ml 坂口フラスコあるいは2 L 坂口フラスコを用いて行った。50 ml 試験管の場合 300 rpm、500 ml 坂口フラスコの場合 100~110 rpm、2 L 坂口フラスコの場合 90~100 rpm で振とう培養した。培養温度は、液体培養とプレート培養ともに30°C である。

【0083】

(制限酵素処理)

制限酵素処理は、メーカーの推奨する反応条件、あるいはSambrook等編、Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載の方法に従って行った。

【0084】

本発明の実施において、多くの市販のキットを用いたが、特に断らない限り添付の使用説明書に従って行った。

【0085】

(実施例1) 相補ベクター、破壊用遺伝子及びマーカー回復型破壊用遺伝子の作製

東京大学より分与されたURA3遺伝子をマーカーとして持つマルトーサ用ベクターであるpUTU-1を配列番号7及び8に記載のプライマー(de1-sal-5, de1-sal-3)を用いてStratagene社製クイックチエンジキットによりURA3遺伝子中のSalI制限酵素サイトを破壊したベクターpUTU-de1salを作製した。この、pUTU-de1salからSalIとXhoIでURA3遺伝子を切り出し、切り出した断片を再びpUTU-1のXhoIサイトに導入したプラスミドpUTU-2を作製した。pUTA-1(WO01/88144に記載)上のADE1遺伝子をpUTU-2のXhoIサイトにクローニングし、pUTU-2-Adeを作製した。pUTU-1のマルチクローニングサイトのSalIサイトに、pUC119にクローニングされていたHIS5遺伝子をクローニングしpUTU1-Hisを作製した。更に、pUTU-2-AdeのマルチクローニングサイトのSalIサイトに、HIS5遺伝子をクローニングしpUTU-2-Ade-Hisを作製した。

【0086】

pUC19のマルチクローニングサイトをNotI-SphI-SalI-XhoI-NheI-SwaI-EcoRIに変更したプラスミドpUC-NxのSphI-SalIサイトにURA3遺伝子の5'末端部分約340baseを配列番号9及び10に記載のプライマー(ura-sph-5, ura-sal-3)を用いてプラスミドpUTU-de1salより増幅しクローニングした。このベクターのNheI-SwaIサイトにURA3遺伝子の3'末端部分約460baseを配列番号11及び12に記載のプライマー(ura-nhe-5, ura-swa-3)を用いてPCR増幅しクローニングした。このようにして、URA3破壊用DNA-1を含むプラスミドが作製された。

【0087】

次に、URA3破壊用DNA-1を含むプラスミドのsalI-XhoIサイトに、pUTA-1のADE1遺伝子全長を配列番号13及び14に記載のプライマー(a(de-sal-5, ade-xho-3)を用いてPCR増幅・挿入してURA3破壊用DNA-2を含むプラスミドを作製した。

【0088】

URA3破壊用DNA-3(マーカー回復型)を含むプラスミドは、ADE1遺伝子の5'末端部分約600baseを配列番号15及び16に記載のプライマー(ade-xho-5, ade-nhe-3)を用いてPCR増幅しURA3破壊用DNA-2を含むプラスミドのXhoI-NheIサイトにクローニングして完成させた。

【0089】

HIS5破壊用DNA(マーカー回復型)を含むプラスミドはpUC119にクローニングされているHIS5遺伝子の5'末端部分約500baseを配列番号17及び18に記載のプライマー(his-sph-5, his-sal-3)を用いて、HIS5遺伝子の3'末端部分約540baseを配列番号19及び20に記載のプライマー(his-nhe-5, his-swa-3)を用いて、URA3破壊用DNA-3を含むプラスミドのSphI-SalIサイト、NheI-SwaIサイトを入れ替える形で、それぞれ順次クローニングする事により作製した。

【0090】

(実施例2) ADE1/URA3/HIS5遺伝子破壊株の作製とマーカーの回復法

キャンディダ・マルトーサAC16株を10m1の大試験管でYPD培地にて終夜培養した。この、前培養した酵母を1m1/100m1坂口フラスコとなるようYM培地に植菌し、6時間培養後集菌した。菌を20m1の1M Sorbitolに懸濁し、3回洗浄した。最後に菌体を1M Sorbitol 0.5m1に懸濁し、コンピテント細胞とした。このコンピテント細胞0.1m1に、実施例1のURA3破壊用DNA-2を含むプラスミドをSphIとSwaIで制限酵素処理したDNAを0.1mg加え電気パルス法による遺伝子導入を行った。電気パルスをかけた後キュベットに1M Sorbitolを1m1入れ、氷冷下1時間放置し、SDプレートに蒔いた。出現したコロニーより染色体抽出キットのジェントルくん（宝酒造社製）を用いて染色体DNAを抽出した。得られた染色体DNA 5μgずつを3種類の方法ScaI、EcoT14I、ScaI+EcoT14Iで制限酵素処理して切断し0.8%アガロースゲルで電気泳動を行った。Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 9.31-9.57, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に従ってゲルからハイボンドN+フィルター（アマシャム社製）に1晩トランスファーした。サザンプロット検出用プローブは、URA3遺伝子内の配列であるScal IN de I断片(340bp)をGene Imageラベリング・検出キット（アマシャム社製）で酵素標識したものを用いた。ハイブリダイズ後、洗浄し、同キットの蛍光発色試薬でDNAバンドを検出した。検出バンドを野生株IAM12247のものと比較したところ、野性株では約570kbのバンドを示すScaI+EcoT14I処理したDNAが新たにADE1遺伝子のURA3遺伝子中への挿入を示す1840bpのバンドも示す株を選択した。この株は、ScaIやEcoT14I処理のバンドでも理論値を示し、URA3遺伝子の一つがADE1遺伝子により正確に破壊されたと確認された。

【0091】

次に、この株より上記と同様に調製したコンピテント細胞に、URA3破壊用DNA-2を含むプラスミドを配列番号9及び12に記載のプライマーでPCR法により増幅したDNA 0.5mg加え、上記と同様に電気パルス法による遺伝子導入を行った。パルスをかけた後にYM培地100m1に植菌し1晩培養した。菌体を回収し、M培地（硫酸アンモニウムなし）で1晩培養した。菌体回収後、M培地（硫酸アンモニウム有り）に移し、6時間晩培養後にナイスタチンを終濃度0.01mg/m1になるように加え更に1時間培養した。菌体を洗浄し菌体をアデニン入りSDプレートにスプレッドした。出現した赤色コロニーよりゲノムDNAを抽出した。ここで得られたアデニン要求性株のゲノムは配列番号21及び22に記載のプライマーura3-5とura3-3を用いて増幅を行ったところ元株でインタクトなURA3遺伝子の0.9kbの増幅と共に増幅する2.3kbのDNAが消失し、代わりに0.7kbのDNAが増幅した。配列番号23及び24に記載のプライマーadeY110-5とadeY1670-3を用いて増幅を行ったところ1.0kbのDNAのみが増幅した。これらのことから、部位特異的に1つ目のURA3遺伝子破壊に用いたADE1遺伝子全領域が特異的に除去されていると判断した。この内の一株をU-1株と命名し、次の実験に用いた。

【0092】

このU-1株よりコンピテント細胞を調製し、HIS5破壊用DNAを含むプラスミドを制限酵素SphIとSwaIで処理し精製したDNA 0.04mgを加え電気パルス法による遺伝子導入を行った。条件は実施例1と同じである。この菌体を、ヒスチジン含有SDプレートにスプレッドし30℃でインキュベートした。出現したコロニーよりゲノムDNAを回収した。HIS5遺伝子中の破壊用遺伝子のHIS5遺伝子と相同性のある部分のフランкиング部位のプライマー、即ち破壊用遺伝子には含まれていないHIS5遺伝子のプライマーであるhis-sal2とhis-1900（配列番号25及び26）を用いてゲノムDNA増幅を行ったところインタクトなHIS5遺伝子のサイズである1.9kbのバンドと共にHIS5破壊用DNAのサイズである3.4kbが増幅する株を選択

した。

【0093】

この株を先に示した方法と同様の方法でナイスタチン濃縮を行った。アデニン含有SDプレートにスプレッドし、得られた赤色コロニーよりゲノムDNAを抽出し、*his-sa12*と*his-1900*（配列番号25及び26）を用いてゲノムDNA增幅を行ったところ、インタクトなHIS5遺伝子のサイズである1.9kbのバンドのみの増幅を認め、破壊用遺伝子を含んだサイズである3.4kbは増幅しなかった。*ade-xho-5*と*his-swa-3*（配列番号15及び20）を用いてPCR増幅を行ったところ、HIS5遺伝子にADE1遺伝子断片が結合した1.2kbのバンドが増幅していた。このことから、得られたアデニン要求性株は、リバータントではなく、分子内相同組換えの結果得られたものであると確認された。

【0094】

次に、この株よりコンピテント細胞を調製し、HIS5破壊用DNAを含むプラスミドを制限酵素SphIとSwaIで処理し精製したDNA0.05mgを加え電気パルス法による遺伝子導入を行った。この菌体を、ヒスチジンを含むSDプレートにスプレッドし30℃でインキュベートした。出現コロニーをSDプレートとヒスチジンを含むSDプレートにレプリカし、ヒスチジン要求性株を得た。得られたヒスチジン要求性株よりゲノムDNAを抽出し、*his-sa12*と*his-1900*（配列番号25及び26）を用いてゲノムDNA増幅を行ったところ親株で増幅する破壊されたHIS5遺伝子のサイズである1.9kbのバンド以外に破壊用遺伝子を含んだのサイズである3.4kbが増幅する株を選択した。この株は*his-sa12*と*ade-xho-3*（配列番号25及び14）を用いたPCRによりHIS5遺伝子中にADE1遺伝子が組み込まれたことを確かめた。

【0095】

この株を先に示した方法と同様の方法でナイスタチン濃縮を行った。アデニン及びヒスチジン含有SDプレートにスプレッドし、得られた赤色コロニーよりゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを*his-sa12*と*his-1900*（配列番号25及び26）を用いてゲノムDNA増幅を行ったところすべての株で親株の破壊されたHIS5遺伝子のサイズである1.9kbのバンドのみの増幅を認め、破壊用遺伝子を含んだのサイズである3.4kbは増幅しなかった。ヒスチジン及びアデニン要求性をSDプレート、ヒスチジン含有SDプレート並びにアデニン及びヒスチジン含有SDプレートにレプリカする事で確認し、アデニン・ヒスチジンの2重栄養要求性株の完成とした。この内の1株をキャンディダ・マルトーサAH-I5株と命名した。

【0096】

AH-I5株をよりコンピテント細胞を調製し、URA3破壊用DNA-3を含むプラスミドを制限酵素SphIとSwaIで処理し精製したDNAを0.025mg加え電気パルス法による遺伝子導入を行った。この菌体を、ウリジンとヒスチジンを含むSDプレートにスプレッドし30℃で2日間インキュベートした。出現コロニーを、ヒスチジンを含むSDプレートとウリジンとヒスチジンを含むSDプレートにレプリカしウリジン要求性株を選択した。これより染色体DNAを回収しura3-5とura3-3（配列番号21及び22）を用いてPCR増幅を行ったところインタクトなURA遺伝子の0.9kbのバンドが消失し、代わりに破壊用遺伝子のサイズである2.9kbの増幅を確認した。このヒスチジン・ウラシル2重要求性株の内の1つを、キャンディダ・マルトーサHU-591株と命名した。

【0097】

HU-591株を先に示した方法と同様の方法でナイスタチン濃縮を行った。アデニン、ヒスチジン及びウリジン含有SDプレートにスプレッドし、得られた赤色コロニーよりゲノムDNAを抽出した。ura3-5とura3-3（配列番号21及び22）を用いてPCR増幅を行ない、URA3遺伝子にADE1遺伝子が導入された2.9kbのバンドが消失し、代わりにURA3遺伝子にADE1遺伝子断片が残ったサイズである1.2k

bが増幅している株を選択した。ウリジン及びヒスチジン及びアデニン要求性を、アデニン、ヒスチジン及びウリジン含有SDプレート、ヒスチジン及びウリジン含有SDプレート、アデニン及びウリジン含有SDプレート、アデニン及びヒスチジン含有SDプレート、アデニン含有SDプレート、ヒスチジン含有SDプレート、ウリジン含有SDプレート並びにSDプレートにレプリカする事で確認し、アデニン・ヒスチジン・ウラシルの3重栄養要求性株の完成した。この株をキャンディダ・マルトーサAHU-71株と命名した。

【0098】

マーカー回復型破壊用遺伝子を用いた場合、アデニン要求性株の出現頻度は、アデニン破壊用DNAを用いた場合と同程度であるが、目的株取得までに要する時間は約半分に短縮することができた。更に、破壊遺伝子の導入時の目的外部位への挿入を考えなくても良く、解析も容易であった。

【0099】

この実施例に示されるように、分子内相同組換を用いて簡単にマーカー遺伝子を回復することができる事が示された。

【0100】

(実施例3) ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現カセットの構築

キャンディダ・マルトーサでPHA合成酵素遺伝子及びアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子を発現させるために、それぞれの5'上流にキャンディダ・マルトーサ由来プロモーターを、3'下流にターミネーターを連結することにした。プロモーターとしてはA1k2遺伝子(GenBank X55881)のプロモーターの上流にARR配列を付加したプロモーターARRpを、3'下流には共にキャンディダ・マルトーサのA1k1遺伝子(GenBank D00481)のターミネーターALK1tを連結することにした。ARRpは東京大学より分与された遺伝子(配列番号6)のPstIサイトにEcoRI-XhoIリソームを結合させ、EcoT14Iサイトに配列番号27に示した合成DNAを結合させることにより、XhoI及びNdeIで切り出すことの出来る形に変換した。pUAL1(WO01/88144)をEcoRIで切断後、平滑末端化しライゲーションを行うことによりEcoRI切断部位を除去したpUAL2を作製した。pUAL2をPvuII/PvuIで切断し、pSTV28(宝酒造社製)のSmaI/PvuIサイトに結合させpSTAL1を作製した。このpSTAL1をEcoRI/NdeIで切断し、先に述べたARRpと結合させ、pSTAR作製した。

【0101】

配列番号4に記載のphacac149NSがペルオキシソームに配向するように、カルボキシ末端にペルオキシソーム配向シグナルを付加した。付加するペルオキシソーム配向シグナルとしては、カルボキシ末端にSer-Lys-Leu(SKL)のアミノ酸を使用することにした。次にpUCNTにクローニングされていたphacac149NSを鋳型にして、配列番号28と29をプライマーとして遺伝子増幅し、pSTARのNdeI、PstIサイトに結合させ、pSTAR-phacac149NSを構築した。配列番号30から34のプライマーを使用し、塩基配列を確認した。塩基配列決定は、PERIKIN ELMER APPLIED BIOSYSTEMS社製のDNAシークエンサー310 Genetic Analyzerを用いた。

【0102】

次に、化学合成したキャンディダ・マルトーサ用にコドンを変換した配列番号5に記載のラルストニア・ユートロファ(Ralstonia eutropha、H16株、ATCC17699)由来のアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子(phbB)のカルボキシ末端にペルオキシソーム配向シグナルを配列番号35及び36に記載のプライマーで増幅することにより付加し、次に、実施例3に記載のpSTARのNdeI、PstIサイトに結合させ、pSTAR-phbBを構築した。塩基配列は、上記と同様の方法で確認した。

【0103】

マルトーサ用ベクターであるpUTA-1のSal Iサイトに、pSTAR-phac_{ac}S149NSよりSal IとXho Iで切り出した合成酵素発現カセットを2個導入しpARR-149NSx2を作製した。更にこのベクターのSal IサイトにpSTAR-phbBSよりSal IとXho Iで切り出したphbB発現カセットを1個導入しpARR-149NSx2-phbBを作製した。

【0104】

キャンディダ・マルトーサの染色体上の破壊されたHIS5遺伝子部分に、異種遺伝子を導入するための導入用遺伝子を実施例1に記載のHIS5破壊用DNAを用いて作製した。HIS5破壊用DNAをSal IとXho Iで切断し、ADE1遺伝子を除去し、代わりにpUTU-delSalIからSal IとXho Iで切断したURA3遺伝子を導入したプラスミドを作製した。このベクターのSal Iサイトに、実施例3で作製したpSTAR-phac_{ac}C149NSより、Sal IとXho Iで発現カセットを切り出し、結合させた。次にこのプラスミドのXho IサイトにpSTAR-phac_{ac}C149NSよりSal IとXho Iで発現カセットを切り出し、結合させ導入用DNA1を含むプラスミドを作製した。さらにpSTAR-phbBより、Sal IとXho Iで切り出したphbB発現カセットを導入用DNA1を含むプラスミドのXho Iサイトに結合させ、導入用DNA2を含むプラスミドを作製した。

【0105】

キャンディダ・マルトーサの染色体上の破壊されたURA3遺伝子部分に、異種遺伝子を導入するための導入用遺伝子を実施例1に記載のURA3破壊用DNA-1を含むプラスミドを用いて作製した。URA3破壊用DNA-1を含むプラスミドのSal I-Xho Iサイトに配列番号37及び38に記載のプライマーでPCR増幅したHIS5遺伝子を導入したプラスミドを作製した。このプラスミドのXho IサイトにpSTAR-phbBよりSal IとXho Iで発現カセットを切り出し結合させた。このプラスミドのSal Iサイトに実施例3で作製したpSTAR-phac_{ac}C149NSよりSal IとXho Iで発現カセットを切り出し結合させ、導入用DNA-3を含むプラスミドを作製した。このSal Iサイトに、phac発現カセットの代わりに、phbBの発現カセットを結合させた導入用DNA-4を含むプラスミドも作製した。

作製した、遺伝子導入用DNA-1～4の略図を図1に示した。図1において、括弧内の数字は、それぞれ用いた遺伝子断片のGeneBankに登録されている遺伝子の5'末端からの番号を示している。ADE1遺伝子:D00855、URA3遺伝子:D12720、HIS5遺伝子:X17310である。太枠部位は、染色体DNAとの相同部位を示している。

【0106】

(実施例4) 組換え株の構築

実施例2において作製したキャンディダ・マルトーサAHU-71株を、実施例2に記載の方法で電気導入用コンピテント細胞を調製した。このコンピテント細胞に、制限酵素Not IとSwa Iで処理した0.05mgの導入用DNA1及び2を電気導入し、アデニン及びヒスチジン含有SDプレートにスプレッドした。出現したコロニーより染色体DNAを調製し、配列番号25及び26で示されるプライマーを用いてPCRを行った。破壊されたHIS5遺伝子に相当する1.9kbの遺伝子の他に、導入用DNA1及び2に相当する大きさの遺伝子が増幅するコロニーをHIS5遺伝子部位に導入された株として選択した。更に、種々のプライマーを用いたPCRにより、これら導入した遺伝子に欠失がないことなどを確認した。

【0107】

次にこれらの株より同様に電気導入用コンピテント細胞を調製した。このコンピテント細胞に、制限酵素Not IとSwa Iで処理した0.05mgの導入用DNA3及び4を電気導入しアデニン含有SDプレートにスプレッドした。出現したコロニーより染色体DNAを調製し、配列番号19及び20で示されるプライマーを用いてPCRを行った。破壊されたURA3遺伝子に相当する0.7kb及び1.2kbの遺伝子の内、どちらかの遺

伝子の増幅を認めず、代わりに導入用導入用DNA3及び4に相当する大きさの遺伝子が増幅するコロニーをURA3遺伝子部位に導入された株として選択した。更に、種々のプライマーを用いたPCRにより、これら導入した遺伝子に欠失がないことなどを確認した。

【0108】

キャンディダ・マルトーサAC16株に、実施例3で作製したpARR-149NS_x2-phbBを形質転換し、phaCac149NS発現カセットが2コピー、phbB発現カセットが1コピー挿入された株をA株とした。キャンディダ・マルトーサAHU-71株に、導入用DNA1と4を用いて作製した、染色体上にphaCac149NS発現カセットが2コピー、phbB発現カセットが2コピー挿入された株をB株とした。キャンディダ・マルトーサAHU-71株に、導入用DNA1と3を用いて作製した、染色体上にphaCac149NS発現カセットが3コピー、phbB発現カセットが1コピー挿入された株をC株とした。キャンディダ・マルトーサAHU-71株に、導入用DNA2と3を用いて、染色体上にphaCac149NS発現カセットが3コピー、phbB発現カセットが2コピー挿入された株をD株とした。C株にpARR-149NS_x2-phbBを形質転換し、phaCac149NS発現カセットが5コピー、phbB発現カセットが2コピー導入されたE株を作製した。D株にpARR-149NS_x2-phbBを形質転換し、phaCac149NS発現カセットが5コピー、phbB発現カセットが3コピー導入された株されたF株を作製した。導入用DNA2と4を用いて作製した染色体上にphaCac149NS発現カセットが2コピー、phbB発現カセットが3コピー挿入された株にpARR-149NS_x2-phbBを形質転換し、phaCac149NS発現カセットが4コピー、phbB発現カセットが4コピー導入された株されたG株を作製した。このG株をCM313-X2Bと命名し国際寄託(FERM BP-08622)した。同様にコントロールとして、キャンディダ・マルトーサAC16株にpUTA-1を形質転換した株(control-1)、pARR-149NS_x2を形質転換した株(control-2)も作製した。作製した株の概要を表1に示した。

【0109】

【表1】

	宿主	プラスミド	染色体組み込み		発現カセット合計数	
			HIS5座	URA3座	phaC	phbB
control-1	AC16	pUTA-1	なし	なし	0	0
control-2	AC16	pARR-149NS _x 2	なし	なし	2	0
A	AC16	pARR-149NS _x 2-phbB	なし	なし	2	1
B	AHU-71	pUTA-1	導入用DNA-1	導入用DNA-4	2	2
C	AHU-71	pUTA-1	導入用DNA-1	導入用DNA-3	3	1
D	AHU-71	pUTA-1	導入用DNA-2	導入用DNA-3	3	2
E	AHU-71	pARR-149NS _x 2-phbB	導入用DNA-1	導入用DNA-3	5	2
F	AHU-71	pARR-149NS _x 2-phbB	導入用DNA-2	導入用DNA-3	5	3
G	AHU-71	pARR-149NS _x 2-phbB	導入用DNA-2	導入用DNA-4	4	4

【0110】

(実施例5) 組換え株を使用したポリマー生産

ポリマー生産に必要な遺伝子を導入したキャンディダ・マルトーサ組換え株A～G株、control-1及びcontrol-2を次のように培養した。培地はSD培地を前培養に、炭素源としてバーム核油を含むM2培地を生産培地として使用した。各組換え株のグリセロールストック500μlを50mlの前培地が入った500ml坂口フラスコに接種して20時間培養し、300mLの生産培地を入れた2L坂口フラスコに10v/v

%接種した。これを培養温度30℃、振盪速度90r.p.m.、2日培養という条件で培養した。培養液を遠心分離によって菌体を回収し、80m1の蒸留水に懸濁して超高压ホモジナイザー（APV社製 Ranniere 2000 15000Psiで15分）で破碎した後、遠心分離を行い得られた沈殿物をメタノールで洗浄した後、凍結乾燥した。得られた乾燥菌体を粉碎し、1gを秤量した。これに、クロロホルムを100m1添加し一晩攪拌して抽出した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで10m1にまで濃縮し、濃縮液に約50m1のヘキサンを添加して、ポリマーを析出させ乾燥させた。得られたポリマーは、NMR分析（J EOL製、JNM-E X 400）にて組成分析を行った。重量平均分子量の測定は、回収した乾燥ポリマー10mgを、クロロホルム5m1に溶解したのち、この溶液をShodex K805L（300x8mm、2本連結）（昭和電工社製）を装着した島津製作所製GPCシステムを用いクロロホルムを移動相として分析した。分子量標準サンプルには市販の標準ポリスチレンを用いた。

【0111】

結果を表2に示した。本発明の新規変異株用いることで、極めて効率的にPHAを生産できることを示している。また、ポリエステル生合成に関与する遺伝子をそれぞれ2コピー以上導入することが、ポリエステルの効率的な生産に極めて重要であること、発現カセットの導入数により分子量や組成が制御可能であることが明らかとなった。

【0112】

【表2】

	ポリマー含量 (重量%)	3HH分率 (mol%)	重量平均分子量 (M. W.)
control-1	0	—	—
control-2	14	—	—
A	25	18.1	800000
B	35	12.4	1200000
C	31	18.9	600000
D	40	14.3	1000000
E	43	15.5	350000
F	45	14.6	550000
G	45	12.2	900000

【産業上の利用可能性】

【0113】

本発明により、生分解性かつ優れた物性を有する下記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合ポリエステルを、酵母において効率的に生産することが可能になった。また、酵母において複数回の遺伝子導入を効率的に行うことが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0114】

【図1】実施例4において作製し、用いた遺伝子導入用DNA-1～4の模式図である。

【図2】分子内相同組換えの模式図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 鐘淵化学工業株式会社 KANEKA CORPORATION

<120> 新規形質転換体およびそれを用いたポリエステルの製造方法

<130> B040070

<160> 38

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 594

<212> PRT

<213> Aeromonas caviae

<400> 1

Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr
1 5 10 15

Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala
20 25 30

Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu
35 40 45

Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp
50 55 60

Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln His Thr Leu Leu Lys Ser Ala
65 70 75 80

Gly Gln Pro Ser Gln Pro Val Ile Thr Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg
85 90 95

Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys
100 105 110

Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala
115 120 125

Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr
130 135 140

Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn
145 150 155 160

Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val
165 170 175

Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln
180 185 190

Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp
195 200 205

Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu
210 215 220

Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu Thr Val Gly Lys Thr Pro Val
225 230 235 240

Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg
245 250 255

Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu Val Ala Gln Gly Gln Thr Val
260 265 270

Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp
275 280 285

Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val
290 295 300

Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile
305 310 315 320

Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg
325 330 335

Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp
340 345 350

Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile Phe Ile His Glu Pro Ile Ile
355 360 365

Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg
370 375 380

Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp
385 390 395 400

Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe
405 410 415

Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr
420 425 430

His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys
435 440 445

Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys
450 455 460

Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val Asp Asp His Ile Ala Leu Trp
465 470 475 480

Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe
485 490 495

Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala
500 505 510

Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro
515 520 525

Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro
530 535 540

Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val
545 550 555 560

Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr
565 570 575

Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp
580 585 590

Ala Ala

<210> 2
<211> 246
<212> PRT
<213> Ralstonia eutropha

<400> 2

Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly
1 5 10 15

Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
20 25 30

Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln
35 40 45

Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp
50 55 60

Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly
65 70 75 80

Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val

85

90

95

Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn
100 105 110

Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala
115 120 125

Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln
130 135 140

Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu
145 150 155 160

His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val
165 170 175

Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys
180 185 190

Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val
195 200 205

Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu
210 215 220

Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn
225 230 235 240

Gly Gly Leu His Met Gly
245

<210> 3

<211> 2196

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial sequence

<400> 3
taacagtgatg attttttcc ctctcccgtc gattgagggtt tttttttctt ctttcgtctt 60
ggtctttgc ttttcaactcc aaaaatggaa acacgcgcgg ctcaactcga aatccgtgat 120
caaaaaaata aaggctgtga gtttcgagcc aataattatg aatttagtggt atttttttta 180
aagataaaata atcaagaatc gcatttaggga gacgaatatg cgttattcaa ataaaaagac 240
aattctttta gggttagcatt tcccttcaag ttcatcccac atgtacattha atgtcaatga 300
tgtcgcagaa gttaaattag cagaagaaaa aaaaaatgtg aattactcgc agtcaactct 360
tctttctctt ctttttttc ttctttatca ccataatcac caccaccacc accaccacca 420
gctcccagat gacttcaact aacttagaag gaactttccc attgattgcc aaaggtaaag 480
tcagagatat ttaccaagtt gacgacaaca ctctttatt cgttgctact gatagaattt 540
ccgcatacga tgtgattatg tctaattggta tcccaaataa agtaaaatc ttaaccaaatt 600
tgtctgaatt ctggtttcat ttcttgccaa ttgaaaacca ttaatcaaa ggagacattt 660
tccaaaaata tcctcaacta gaaccatata gaaaccaatt ggaaggcaga tccttacttg 720
ttagaaaaatt gaaattgatc cctcttgaag ttattgttag aggttacatc accggttccg 780
gctggaaaga ataccaaaaa tctaaaaccg tccacggtat tcctattggt gatgtggttg 840
aatcacaaca aatcactcct atcttcaccc catccactaa agcagaacaa ggtgaacatg 900
atgaaaatat caccaaaagaa caagctgaca agattgttg aaaagaattha tgtgatagaa 960
ttgaaaaat tgctattgat ttgtacacca aagccagaga ttacgctgcc actaaaggaa 1020
ttattatcgc tgatactaaa tttgaatttg gtttagatgg tgacaacatc gttcttggtt 1080
acgaagttt aactccagat tcttccagat tctggaaatgc tgctaaatac gaagttggta 1140
aatctcaaga ctcttacgat aaacaatttt tgagagattg gttacttct aatggtggtt 1200
ctggtaaaga tggtggtgct atgcctgaag acattgtcac taaaaccaag agcaaatacg 1260
ttgaagctta cgaaaattta actggtgaca aatggcaaga ataaattaag gatacttatt 1320
ataaaagctt tctatattatc ccaaacttcc gtagtatttt ctgacatgtt cagatgtttt 1380
tactttatct ttcctgaaat tttgatttc taaccgactc ttgcgtgtt ctcttgataa 1440

tgcaacat at gcttgaccat tagcaaaaact tctaccta aaaa tctat tttga ctctgtccaa 1500
agtttgcacct tgagctttgt ggatcgacat cgcccacgac aagatcat tt ggtttggttct 1560
cgagtaacag tatgat tttt ttccctctcc cgtcgattga ggtttttttt ttctcttcg 1620
tcttggtctt ttgctttca ctccaaaaat ggaaacacgc gcggctcaac tcgaaatccg 1680
tgatcaaaaa aataaaggct gtgagttcg agccaataat tatgaatttag tggtat tttt 1740
tttaaagata aataatcaag aatcgcat ta gggagacgaa tatgcgttat tcaaataaaaa 1800
agacaattct tttaggtag cat tccctt caagttcata ccacatgtac attaatgtca 1860
atgatgtcgc agaagttaaa tt tagcagaag aaaaaaaaaa tgtgaattac tccgagtc aa 1920
ctcttcttcc tcttcttctt tttcttctt atcaccataa tcaccaccac caccaccacc 1980
accagctccc agatgacttc aactaactta gaaggaactt tcccatgtat tgccaaagg 2040
aaagtcagag atat ttaacca agttgacgac aacactctt tattcggtgc tactgataga 2100
at tccgcat acgatgtat tatgtcta at ggtatccaa ataaaggtaa aatcttaacc 2160
aaattgtctg aattctggtt tgatttcttgc ccaatt 2196

<210> 4
<211> 1785
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 4
atgtctcaac catcttatgg tccattgttc gaagctttgg ctcattacaa tgataaattt 60
ttggctatgg ctaaagctca aaccgaaaaga actgctcaag ccttggcata aactaactt 120
gatgat tttgg gtcaagttttt ggaacaagg tctcaacaac catggcaatt gattcaagct 180
caaatgaatt ggtggcaaga tcaat taaa ttgatgcaac acactttgtt aaaatctgct 240
gg tcaaccat ctgaaccagt tattactcca gaaagatctg atagaagatt taaagctgaa 300
gcttggtctg aacaaccaat ttatgattac ttaaaaacaat cctat tttgtt aactgctaga 360
cat tttgttgg cttctgttga tgctttggaa ggtgtccac aaaaatctag agaaagattt 420

agatttcttta ctagacaata cgtctccgct atggctccat ctaatttctt ggctactaac 480
ccagaatttgt taaaattgac tttggaatcc gatggtc当地 atttggttag aggtttggct 540
ttattggctg aagatttggaa aagatctgct gatcaattaa acattagatt gactgatgaa 600
tccgcttttg aattaggtag agatttggct ttgactccag gttagagttgt tcaaagaact 660
gaattatatg aattaattca atactctcca actactgaaa ccgttggtaa aaccccagtt 720
ttgatcggtc caccattcat taataaatat tacattatgg atatgagacc aaaaaactcc 780
ttggtcgcgtt gggtggtcgc tcaaggtaa accgtttca tgatttcctg gagaaaccca 840
ggtgttgcgtc aagctcaaat tgatttagat gattatgttgg ttagatgggt cattgctgct 900
ttggatggtg ttgaagccgc tactggtgaa agagaagttc acggatttgg ttactgtatt 960
ggtgttacccg ctttgtcttt agctatgggt tgggtggccg ccagaagaca aaaacaaaaga 1020
gttagaactg ctactttgtt tactactttg ttggatttct cccaaaccagg tgaattgggt 1080
attttatttca atgaaccaat tatcgccgccc tttagaagccc aaaatgaagc taaaggattt 1140
atggatggta gacaattggc cgtctcccttc tctttgttga gagaaaactc tttatattgg 1200
aattactata ttgattctta cttaaaaggt caatctccag ttgcttttga tttgttgcac 1260
tggaaactctg attctactaa tggttgcgggt aaaactcata actctttgtt gagaagattt 1320
tatttggaaa atcaatttgtt taaagggtgaa ttaaaaattt gaaacactag aattgattt 1380
ggtaaaggtt aaactccagt ttgttgggtt tctgccccgtt atgatcacat tgctttatgg 1440
caaggtacct ggcaaggtat gaaattgttc ggtggtgaaac aaagattttt attggccgaa 1500
tccggtcata ttgctggat tattaatcca ccagctgcta acaaatacgg tttctggcac 1560
aatggtgctg aagctgaatc tccagaatct tgggtggctg gtgccaccca tcaagggtgg 1620
tcctggtgcc cagaaatgtt gggttttatt caaaacagag atgaagggttc tgaaccagtc 1680
ccagccagag tcccagaaga aggtttggct ccagctccag gtcactatgt caaagttaga 1740
ttaaaccagg ttttcgcttg tccaaaccgaa gaagatgctg cttaa 1785

<210> 5

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial

220

<223> synthetic DNA

<400> 5

a t g a c t c a a a a g a a t t g c c t a c g t t a c t g g t g g t a t g g g t g g t a t t g g t a c t g c t a t t t g t 6 0

caaagatgg ctaagatgg tttagagtt gttgctggtt gtggtccaaa ctctccaaaga 120

a g a g a a a a a a t g g t t g g a a c a a c a a a a a a g c t t t g g g g t t t c g a t t t t a t t g c t t c t g a a g g t 1 8 0

a a t g t t g c t g a t t g g g a t t c t a c t a a a a c t g c t t t c g a t a a a g t c a a a t c c g a a g t c g g t 240

g a a g t t g a t g t t t t g a t t a a c a a t g c t g g t a t t a c t a g a g a t g t t g t t t t t a g a a a a a a t g 3 0 0

act tag ag gct g att tggg gat gc cgtt att gat act aact tt ga ctt ct tt gt t caa at gt tc act 360

aaaaacaagttatgtatggatggctgtatagaaggttgggtatgaattgttcaacatttcattct 420

g t t a a t g g t c a a a a a g g t c a a t t t g g t c a a a c t a a c t a t t c c a c t g c t a a a g c t e g g t t t g 480

catgggtttca ctatggcttt ggcccaagaaa gttgccacta aagggtgttac tggtcataacc 540

g t c t c t c c a g g t t a c a t t g c t a c t g a t a t g s t c a a a g c c a t t a g a c a a a g a t t g t t t t a g a t 6 0 0

aaaaattgtcg ccaccatcc agtcaaaaaga ttgggtttgc cagaagaaaaat tgcttcatt 660

t g t g c t t g g t t g t c t t c t g a a g a a t c c g s t t t t f c t a c t g g t g c t g a t t c t c t t t a a a c 720

g g t g g t t t g c a c a t g g g g t t a a

<210> 6

〈211〉 754

<212> DNA

<213> Artificial

220

<223> synthetic DNA

〈400〉 6

t t t t a t c c g c t c a t g t g c t t t t t t t t g t t t c a a t t t g a a a g t t t t t t t a t t t c c g c a 180

tgtttcaat ttgaaagttt ttttatttcc gcaataaaaa attattttt atccgctcat	300
gtgcgtttttt ttttgttttc aatttgaag ttttttatt tccgcaatac aaaatttattt	360
tttacccgct gaccaggatc ctctagagtc catgtgcattt ttttttgtt ttcaatttga	420
aagttttttt atttccgcaa tacaaaatta ttttttatcc gctcatgtgc tttttttttt	480
gttttcaatt tgaaagttt tttatccg caataaaaa ttatttttta tccgctgacc	540
cagatctcga ctctagagga tccccgtttt tttatccg caataaaaa ttatttttta	600
tccgctttcc gttcctttct tcattgtata aatctcaaca attatatata tcattccata	660
accctgaata atttttttt taagtccttg gtttctttt tttagaaaaaa aggtgaatca	720
gtaaaatttt tgttatattt cattttaact caca	754

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 7
ctctgtgcat cagtgacgt tcaaaccaca 30

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 8
tgtggtttga acgtccactg atgcacagag 30

<210> 9
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 9
aattgcatgc cagtactttt ttgtgtaaca ttcac 35

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 10
aattgtcgac atgaaaagtc gtcgattatg 30

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 11
aattgttagc caaggggttt gttgatgttg 30

<210> 12
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 12
ttaattaatt taaataatcc cgaagattac gatgaagt 38

<210> 13
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 13

aattgtcgac taacagtagt attttttcc ctct

34

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 14
aattctcgag aacaaaccaa atgatcttgt cgta 34

<210> 15
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 15
aattctcgag taacagtagt attttttcc ctct 34

<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 16
aattgttagc aattggcaag aaatcaaacc a 31

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 17
aattgttagc gggtccacact aagaatgtt t 31

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 18
aattgtcgac agcttaatgt ttggatcaga 30

<210> 19
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 19
aattgctagc agatttaggg gttctgaatt g 31

<210> 20
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 20
ttaatttaatt taaatcaaat tgttgacctt tgttc 35

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 21
atggatatcca ccaaaaacata cacc 24

<210> 22

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 22
a a t t t c g a a g a t t a c g a t g a a g t t 24

<210>	23
<211>	24
<212>	DNA
<213>	Artificial

<220>
<223> primer

<400> 23
taacagttatg attttttcc ctct 24

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 24
 a a c a a a c c a a a t g a t c t t g t c g t g 24

<210>	25
<211>	38
<212>	DNA
<213>	Artificial

<220>
<223> primer

<400> 25
aattgtcgac aattcattat tacagagtaa gatttgtt 38

<210>	26
<211>	23
<212>	DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 26

t t c t g t g c t g t t g g t g a t t t c a t

23

<210> 27

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 27

g t c c t t g g t t t c t t t t t t a g a a a a a a g g t g a a t c a g t a a a a t t t t g t t a t t t a t c a t

60

t t t a a c t c a c a t a t g a a g a t a t c

83

<210> 28

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 28

a c a c a t a t g t c t c a a c c a t c t t a t g g t c c a t t g t t c g a a g c t t t g g c t c a t t a c a a t g a t

60

a a a t t g t t g g c t a t g g c t a a a g c t c a a a c c g a a a g a a c t

99

<210> 29

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 29

a t g g t a c t g c a g t t a c a a t t t a g a a g c a g c a t c t t c t t c g g t t g g

45

<210> 30

<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 30
actaacttgg atgatttggg tc 22

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 31
ctaatttctt ggctactaac cc 22

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 32
agttttgatc gttccaccat tc 22

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 33
catgaaccaa ttatcgccgc 20

<210> 34
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 34

gttgtttcttgcggatgat

22

<210> 35

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 35

cgggaattcaatgactcaaagaattgcctaa

31

<210> 36

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 36

ctgcagttacaattttagaacccatgtgcaaaccacccgtt

39

<210> 37

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 37

aattgtcgacggtccacactaagaaatgtttt

31

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 38

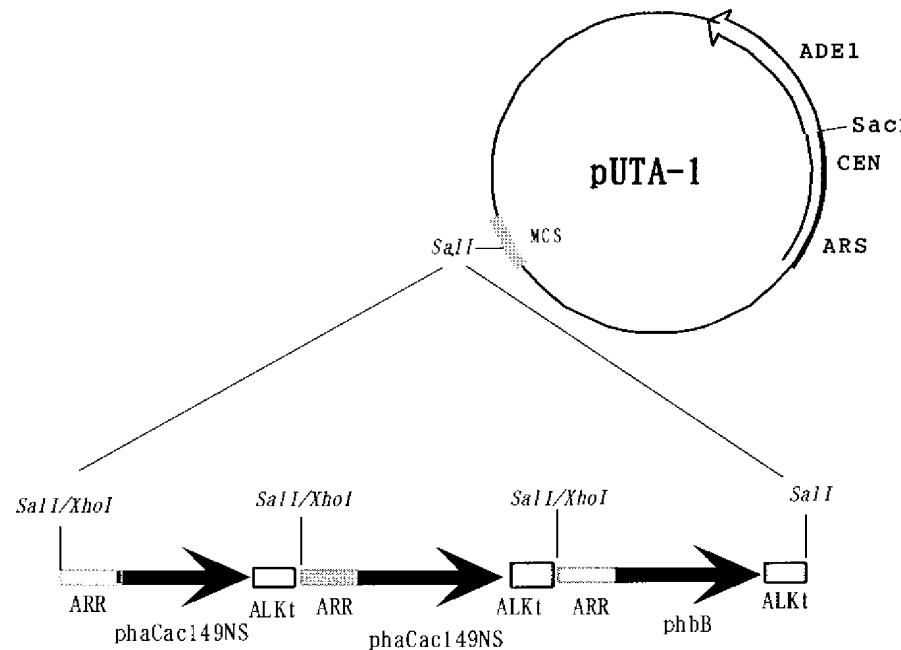
a a t t c t c g a g c a a a t t g t t g a c c t t t g t t c

30

【書類名】図面

【図 1】

pARR-149NSx2-phbB



導入用DNA-1

HIS5(151-645) phaCac149NS URA3(172-1200) phaCac149NS ADE1(110-740) HIS5(1201-1760)

導入用DNA-2

HIS5(151-645) phaCac149NS URA3(172-1200) phaCac149NS phbB ADE1(110-740) HIS5(1201-1760)

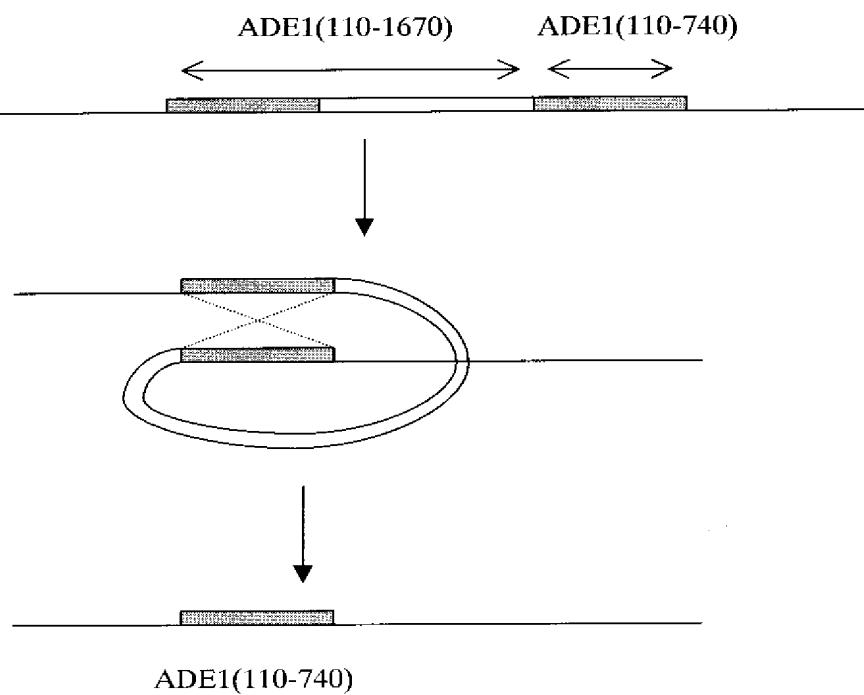
導入用DNA-3

URA3(172-520) phaCac149NS HIS5(151-1760) phbB ADE1(110-740) URA3(743-1200)

導入用DNA-4

URA3(172-520) phbB HIS5(151-1760) phbB ADE1(110-740) URA3(743-1200)

【図 2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 菌体生産性に優れ、遺伝子操作の容易な酵母形質転換体の作製法を提供する。また、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法を開発する。

【解決手段】 分子内相同組換えを利用して、マーカー回復の容易な宿主酵母を作製する。また、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子やアセトアセチル C o A 還元酵素遺伝子といった、ポリヒドロキシアルカン酸の合成に関与する遺伝子を複数導入することにより効率的に、物性の制御されたポリヒドロキシアルカン酸よりなる、共重合ポリエステルを菌体内に蓄積させ、その培養物よりポリマーを採取する。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成16年 3月10日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2004-62812
【補正をする者】
 【識別番号】 000000941
 【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100086586
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 安富 康男
【手続補正】
 【補正対象書類名】 特許願
 【補正対象項目名】 提出物件の目録
 【補正方法】 追加
 【補正の内容】
 【提出物件の目録】
 【物件名】 受託証の写し 1
 【物件名】 受託証の写し 1
 【物件名】 受託証の写し 1

【物件名】

受託証の写し

国際様式

INTERNATIONAL FORM



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7. 1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名（名称） 鎌淵化学工業株式会社
寄託者 代表取締役 武田 正利
あて名 〒 大阪市北区中之島三丁目二番四号

【添付書類】



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Candida maltese AC16	(受託番号) FERM BP- 7366
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ■ 科学的性質 ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成12年11月15日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Bioscience and Human-Technology 名称： Agency of Industrial Science and Technology 所長 大曾 信 Dr. Shigeo Oba Director-General</p> <p>あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566） 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN</p> <p>平成12年(2000)11月15日</p>	

【物件名】

受託証の写し

【添付書類】

書式7(第7条関係)

受 託 証

通知番号 : 15 產生寄 第 1140 号

通知年月日 : 平成 15 年 8 月 15 日

鐘淵化学工業株式会社
代表取締役 武田 正利

殿

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物受託センター長

岡 修一



1. 微生物の識別のための表示

(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
AHU-71	FERM P- 19492

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
 分類学上の位置

3. 受領及び受託

当センターは、平成 15 年 8 月 15 日に受領した1欄の微生物を受託する。

【物件名】

受託証の写し

書式8(第7条第1項関係)

「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブタペスト条約」

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

BUDAPEST TREATY OF THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
Issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL
DEPOSIT AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名（名称）

鐘淵化学工業株式会社
代表取締役 武田 正利 殿

あて名 〒 530-8288
大阪市北区中之島三丁目二番四号

【添付書類】



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) CM313-X2B	(受託番号) FERM BP- 08622
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文章が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、2004年2月13日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年月日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託した。 そして、年月日に原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	
センター長 岡 修 Dr. Syuichi Oka, Director	
あて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566) AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan	
平成16年(04)2月13日	

出願人履歴

0 0 0 0 0 0 9 4 1

19900827

新規登録

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

鐘淵化学工業株式会社

0 0 0 0 0 0 9 4 1

20040901

名称変更

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

株式会社カネカ